

# **Genetische Varianten der ABC-Transporter BCRP und P-Glykoprotein: Analyse der Interaktion mit Telmisartan**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sylvia Deppe  
aus Krefeld

1. Referent: Professor Dr. Ralf Benndorf  
2. Referent: Professor Dr. Sönke Behrends  
eingereicht am: 27.05.2013  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.09.2013

Druckjahr 2013

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge**

**Deppe S**, Ripperger A, Benndorf RA. Genetic variants of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: analysis of interaction with the AT1 receptor antagonist telmisartan. *VKliPha-Kongress 2012*; Publikation des Abstracts im British Journal of Clinical Pharmacology 2013; 75(S1):3.

**Deppe S**, Ripperger A, Benndorf RA. Genetic variants of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: analysis of interaction with the AT1 receptor antagonist telmisartan. 36. *Wissenschaftlicher Jahreskongress der Deutschen Hochdruckliga e. V. 2012*, hier ausgezeichnet mit dem *Young Investigator Award*

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie der Technischen Universität Braunschweig angefertigt.

Meinen Eltern gewidmet

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Laufe der Promotion unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Benndorf für die interessante Themenstellung, die gute Betreuung und die Möglichkeit meine Arbeit auf Tagungen zu präsentieren. Ganz speziell danke ich ihm für die engagierte Zusammenarbeit und die wertvollen Anregungen bei Tagungsbeiträgen, die den Young Investigator Award ermöglicht haben, und beim Verfassen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Behrends danke ich für die stetige Unterstützung und die offene Tür bei allen institutsinternen Fragen sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Prof. Dr. Wittstock danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Allen Kollegen des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie danke ich für das gute Arbeitsklima, die kollegiale Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft. Mareike Busker danke ich im Besonderen für die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden, die Immunfluoreszenzmessungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ines Thomsen danke ich für die Hilfe beim Einrichten des Labors, bei Bestellungen und bei institutsinternen Dingen. Für die Bewältigung von Formalitäten danke ich Susanne Hornig und für die technische Unterstützung im Labor danke ich Anja Stieler, Gerlind Henze-Wittenberg und Carolin Rattunde. Für die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden danke ich weiterhin Nadine Haase und Monika Linnenbaum.

Herrn Dr. Lothar Gröbe danke ich für das *Sorten* meiner Zellen am HZI in Braunschweig.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre liebe Unterstützung und finanzielle Hilfe während meines Studiums und meiner Promotion und meinem Freund Andi, der während meiner gesamten Promotionszeit für mich da war und mich unterstützt hat.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 ABC-Transporter .....	1
1.2 Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) .....	2
1.3 P-Glykoprotein (P-gp).....	6
1.4 Telmisartan.....	10
1.5 Fluoreszenzbasierte Assays zur Untersuchung der Funktionalität von ABC-Transportern.....	13
1.6 Das Tet-System.....	15
<b>2. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
3.1 Material .....	19
3.1.1 Chemikalien und Substanzen .....	19
3.1.2 Lösungen und Puffer.....	20
3.1.3 DNA und Vektoren .....	23
3.1.4 Enzyme und Reagenziensysteme.....	23
3.1.5 Antikörper.....	24
3.1.6 Zellen .....	24
3.1.7 Zellkulturmedien und Zusätze .....	25
3.1.8 Primersequenzen für die Site-Directed-Mutagenesis.....	25
3.1.9 TaqMan Gene Expression Assays .....	27
3.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	27
3.1.11 Software .....	29
3.2 Molekularbiologische Methoden .....	29
3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter E.coli-Zellen .....	29
3.2.2 Transformation kompetenter E.coli-Zellen .....	30
3.2.3 Plasmidpräparationen aus E.coli-Kulturen im kleinen Maßstab (Minipräp) .....	30

3.2.4 Plasmidpräparationen aus E.coli-Kulturen im großen Maßstab (Maxipräp)	31
3.2.5 Analyse der Plasmid-DNA	31
3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	31
3.2.7 Klonierung von Plasmid-DNA in Plasmidvektoren	31
3.2.8 Gezielte Mutagenese bestimmter Nukleotide	35
3.2.9 RNA-Isolierung	36
3.2.10 Messung der RNA-Konzentration	36
3.2.11 Reverse Transkription	36
3.2.12 Quantitative Real-Time-PCR mit Taq-Man-Sonden	37
3.3 Zellbiologische Methoden	38
3.3.1 Zellkulturarbeiten	38
3.3.2 Kultivierung der Zellen	38
3.3.3 Bestimmung der Zellzahl	39
3.3.4 Transfektion der Zellen	39
3.3.5 Ernten der Zellen	39
3.3.6 Kryokonservierung der Zellen	39
3.3.7 Auftauen der Zellen	40
3.3.8 Versuche mit transient transfizierten HEK293-Tet-On- und HEK293-Tet-Off-Zellen	40
3.3.9 Herstellung einer stabilen HEK293-Tet-Off-Zelllinie bzw. einer stabilen HEK293-Tet-On-BCRP-Zelllinie	40
3.3.10 MTT-Test	41
3.4 Proteinbiochemische Methoden	42
3.4.1 Proteinisolierung aus Zellen	42
3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	42
3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) (Laemmli, 1970)	42
3.4.4 Western-Blot-Analyse (Immunoblot-Analyse)	43



3.5 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse .....	44
3.6 Durchflusszytometrie .....	45
3.6.1 PhA-Efflux-Assay .....	46
3.6.2 Calcein-AM-Assay .....	47
3.6.3 Zellsortierung .....	48
3.7 Statistische Analyse .....	48
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
4.1. Etablierung der Tet-Systeme .....	49
4.1.1 Ermittlung der optimalen Antibiotikakonzentration und Zelldichte .....	49
4.1.2 Herstellung einer stabilen Tet-Off-Zelllinie .....	49
4.2 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Doxyzyklin auf das Tet-System .....	51
4.2.1 Doxyzyklin-regulierbare Expression von BCRP im Tet-Off-System .....	51
4.2.2 Doxyzyklin-regulierbare Expression von BCRP im Tet-On-System .....	53
4.2.3 Vergleich der Doxyzyklin-regulierbaren Expression im Tet-On- und Tet-Off-System .....	56
4.3 Einfluss von Telmisartan auf die Zellviabilität .....	56
4.4 Charakterisierung von BCRP-Mutanten in transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen .....	58
4.4.1 Generierung und Überprüfung von BCRP-Mutanten .....	58
4.4.2 Western-Blot-Analyse .....	61
4.4.3 RNA-Analyse .....	63
4.4.4 Immunfluoreszenz-Analysen .....	64
4.4.5 Charakterisierung der Transportkapazität von BCRP-Wildtyp und BCRP-Mutanten .....	65
4.4.6 Durchflusszytometrische Analyse der Funktion von BCRP-Mutanten und ihrer Interaktion mit dem AT <sub>1</sub> -Rezeptorantagonisten Telmisartan .....	66
4.5 Funktionelle Charakterisierung von BCRP-Mutanten in stabil transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen .....	72

4.5.1 Herstellung stabil transfizierter HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen oder -BCRP-Mutanten-Zellen .....	72
4.5.2 Charakterisierung der Zellklone im Hinblick auf die induzierbare BCRP-Proteinexpression .....	74
4.5.3 Durchflusszytometrische Analyse der Funktion von BCRP-Mutanten nach stabiler Transfektion in HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen .....	74
4.6 Einfluss von Serumalbumin auf die inhibitorische Interaktion von Telmisartan mit BCRP .....	75
4.6.1 Bovines Serumalbumin (BSA) .....	75
4.6.2 Humanes Serumalbumin (HSA) .....	76
4.7 Analyse des Effekts von Nisoldipin auf die Funktion von BCRP.....	78
4.8 Validierung des Tet-On-P-gp-Systems.....	79
4.8.1 Doxzyklin-regulierbare Expression von P-gp in HEK293-Tet-On-Zellen .	79
4.8.2 Durchflusszytometrische Analyse der P-gp-Funktionalität .....	79
4.9 Charakterisierung von P-gp-Mutanten nach transienter Transfektion in HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen.....	80
4.9.1 Generierung klinisch relevanter P-gp-Mutanten.....	80
4.9.2 Analyse des Expressionsniveaus der generierten P-gp-Mutanten nach Expression in HEK293-Tet-On-Zellen.....	83
4.9.3 Durchflusszytometrische Analyse der Funktion von P-gp-Mutanten und ihrer Interaktion mit dem AT <sub>1</sub> -Rezeptorantagonisten Telmisartan.....	84
4.10 Analyse des potentiell inhibitorischen Effekts von Nisoldipin auf die Funktion von P-gp.....	86
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>88</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>98</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>117</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 ABC-Transporter

Die *ATP-binding-cassette*-Transporter (ABC-Transporter), auch bekannt als *Multidrug-Resistenz*-Transporter, stellen eine der größten Familien der Transmembranproteine dar. Das charakteristische und namensgebende Merkmal ist die hochkonservierte ***ATP-binding-cassette*** (ABC) (Higgins, 1992). Bisher wurden 48 verschiedene ABC-Transporter im humanen Genom beschrieben (Dean et al., 2001). Diese werden heute, basierend auf strukturellen Ähnlichkeiten, in die sieben Unterfamilien ABCA bis ABCG eingeteilt (Sarkadi et al., 2006). Alle bekannten ABC-Transporter bestehen in ihrer funktionellen Form typischerweise aus zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBDs) und zwei transmembranären Domänen (TMDs) (Hollenstein et al., 2007). Eine Nukleotidbindungsdomäne enthält drei konservierte Motive, die an der ATP-Bindung und Hydrolyse beteiligt sind. Diese Motive sind die Walker A- und Walker B-Motive (Walker et al., 1982) und die sogenannte ABC-Signatur (C-Schleife), die zwischen dem Walker A- und dem Walker B-Motiv liegt (Dean et al., 2001). Eine transmembranäre Domäne mit sechs bis elf membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices sorgt für den Transport der Substrate und bestimmt die Substratspezifität des Transporters (Higgins, 1995).

Als ATP-abhängige Effluxpumpen mit breiter Substratspezifität dienen ABC-Transporter im Organismus vor allem dem Transport von meist lipophilen Fremdstoffen aus der Zelle heraus (Higgins, 1992). Sie stellen somit einen Schutzmechanismus vor lipophilen Xenobiotika dar (Leslie et al., 2005). Durch ihre Expression in Organen, die eine Barriere darstellen oder an der Exkretion beteiligt sind, regulieren ABC-Transporter pharmakokinetische Eigenschaften von vielen Arzneistoffen wie die Resorption, Verteilung und Elimination (Glavinas et al., 2004; Scherrmann, 2009; Szakács et al., 2008). Viele Arzneistoffe sind Substrate von ABC-Transportern und/oder können die Aktivität dieser Transporter beeinflussen (Sharom, 2008). Daher kann es im Rahmen einer Kombinationstherapie mit Arzneistoffen prinzipiell zu Wechselwirkungen auf der Ebene von ABC-Transportern kommen, die zu einer veränderten Pharmakokinetik und Gewebedisposition von Arzneistoffen und damit zu unerwünschten Wirkungen und Unverträglichkeiten bei der Arzneistofftherapie führen können (FDA, 2012). Im Sinne einer sicheren Arzneistofftherapie ist es deshalb laut der „Draft Guidelines“ der *Food and Drug Administration*

(FDA) wichtig herauszufinden, welche Arzneistoffe Substrate bzw. Inhibitoren von ABC-Transportern sind (FDA, 2012). Für viele ABC-Transporter sind genetische Mutanten (Einzelnukleotid-Polymorphismen oder somatische Mutationen) beschrieben, die die mRNA-Expression, die Proteinexpression bzw. die Bindungsfähigkeit von Substraten oder Inhibitoren an den ABC-Transportern verändern und so das individuelle Ansprechen auf die Arzneistofftherapie modifizieren können (Szakács et al., 2008). Um die Arzneistofftherapie für Menschen mit diesen genetischen Mutanten individuell optimieren zu können, ist die funktionelle und klinische Charakterisierung relevanter genetischer Mutanten von ABC-Transportern ein wichtiges Instrument.

## **1.2 Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)**

BCRP, auch bekannt als Placental ABC-Protein (ABCP) und Mitoxantrone Resistance Protein (MXR), wurde 1998 als erstes von Doyle et al. in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7/AdrVp beschrieben (Doyle et al., 1998). Diese Zelllinie zeigte eine Arzneistoffresistenz in Anwesenheit von Verapamil, einem P-gp-Inhibitor, und führte zu einer ATP-abhängigen Abnahme der intrazellulären Konzentration von Anthrazyklin-Zytostatika, obwohl keine bekannten ABC-Transporter wie P-gp oder MRP1 überexprimiert wurden. Dieses Phänomen wurde auf die Überexpression eines neuen ABC-Transporters zurückgeführt, der aufgrund der Entdeckung in der Brustkrebszelllinie BCRP genannt wurde (Doyle und Ross, 2003). Zeitgleich wurde BCRP auch von Allikmets et. al in der Plazenta (Allikmets et al., 1998) und von Miyake et al. in der Mitoxantron-selektionierten Darmkrebszelllinie S1-M1-80 nachgewiesen (Miyake et al., 1999). BCRP ist Mitglied der ABC-Transporter-Familie ABCG und wird nach der systematischen Nomenklatur als ABCG2 bezeichnet. Neben ABCG2 besitzt die ABC-Transporter-Familie ABCG vier weitere Mitglieder (ABCG1, ABCG4, ABCG5 und ABCG8). BCRP besteht aus 655 Aminosäuren und hat im glykosylierten Zustand ein Molekulargewicht von 72 kDa. Für die Expression und regelrechte Funktion des ABC-Transporters scheint die N-Glykosylierung an Asparagin-596 aber nicht essentiell zu sein (Diop und Hrycyna, 2005). BCRP ist, wie die anderen Mitglieder der ABCG-Familie, ein Halbtransporter, da es nur aus einer N-terminalen NBD und einer C-terminalen TMD mit sechs  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist (Li et al., 2007). Um funktionell aktiv zu sein, d. h. für den Transport seiner Substrate,

muss BCRP vermutlich als Dimer vorliegen (Higgins und Linton, 2004). Häufig wird ein Homodimer über eine Disulfidbrücke gebildet (Henriksen et al., 2005a; Kage et al., 2002). Diese Dimerbildung findet am Cystein-Rest an Position 603 zwischen der transmembranären  $\alpha$ -Helix fünf und der  $\alpha$ -Helix sechs statt (Henriksen et al., 2005a). Die Bildung von funktionell aktiven Heterodimeren oder Oligomeren scheint aber auch möglich zu sein (Henriksen et al., 2005b).

Neben einer pathophysiologisch relevanten Expression in Tumorzellen, wird BCRP auch physiologisch in verschiedenen Geweben exprimiert. Dazu gehören vorwiegend das intestinale Epithel, die Leber (kanalikuläre Membran der Hepatozyten), die Plazenta- und die Blut-Hirn-Schranke (Eisenblätter et al., 2003; Jonker et al., 2002; Maliepaard et al., 2001). In polarisierten Zellen ist BCRP vorwiegend in der apikalen Membran lokalisiert (Eisenblätter et al., 2003; Jonker et al., 2002; Maliepaard et al., 2001). In den verschiedenen Geweben befindet es sich zudem im venösen und kapillaren Endothel (Maliepaard et al., 2001). Weiterhin wird BCRP physiologisch in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (Zhou et al., 2001). Für die Identifizierung der sogenannten „Side Population“, einer spezifischen Population der hämatopoetischen Stammzellen, wird BCRP als Markerprotein herangezogen (Zhou et al., 2001). Eine verstärkte Expression von BCRP in Tumorzellen stellt einen Resistenzmechanismus der Tumorzellen gegenüber Zytostatika dar (Choi, 2005). Durch die physiologische Expression von BCRP an wichtigen Grenzflächen des Körpers, kann eine Rolle von BCRP bei der Pharmakokinetik (Resorption, Verteilung und Elimination) von Arzneistoffen postuliert werden (Szakács et al., 2008). In der Plazenta schützt BCRP den sich entwickelnden Organismus gegenüber endogenen und exogenen Toxinen (Jonker et al., 2000). Jonker et al. konnten zeigen, dass die Inhibition von Bcrp1, einem murinen Homolog von BCRP, durch Elacridar zu einer Zunahme der fetalen Plasmakonzentration des gleichzeitig verabreichten Topotecans führte (Jonker et al., 2000). Zusätzlich erniedrigte Elacridar die hepatobiliäre Exkretion von Topotecan, so dass BCRP auch eine wichtige Funktion in der hepatobiliären Exkretion dieses Chemotherapeutikums einnimmt. Im Intestinum beeinflusst BCRP die orale Resorption von Arzneistoffen. Bei gleichzeitiger Gabe des BCRP-Inhibitors Gefitinib mit Irinotecan in Mäusen kam es zu einer signifikanten Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit von Irinotecan und somit zu einer erhöhten Antitumor-Aktivität des Irinotecans (Stewart, 2004). An der Blut-Hirn-Schranke kann

BCRP den Eintritt von Arzneistoffen in das Gehirn limitieren. Cisternino et al. zeigten, dass Bcrp1 in der Maus die Aufnahme der BCRP-Substrate Prazosin und Mitoxantron in das zentralnervöse Kompartiment einschränkte, wohingegen die Aufnahme des P-gp-Substrats Vinblastin nicht beeinträchtigt wurde (Cisternino et al., 2004).

Neben den eben erwähnten Topoisomerase-Hemmstoffen Irino- und Topotecan, transportiert BCRP zahlreiche weitere Zytostatika, wie z. B. Methotrexat oder das Camptothecin-Derivat SN-38, aber u. a. auch Antibiotika (z. B. Nitrofurantoin), H<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten (z. B. Cimetidin), konjugierte organische Anionen (z. B. Estron-3-sulfat), Chlorophyllabbau-Produkte (z. B. Pheophorbid A) und Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. Hoechst 33342), die für die durchflusszytometrische Analyse von Zellen verwendet werden (Chen et al., 2003; Kim et al., 2002; Merino et al., 2005; Nakatomi et al., 2001; Pavek et al., 2005; Robey et al., 2004; Suzuki et al., 2003). Die TMD des ABC-Transporters ist verantwortlich für die Substraterkennung (Sarkadi et al., 2004). Miwa et al. zeigten, dass Aminosäureaustausch-Mutationen in den transmembranären  $\alpha$ -Helices zwei, drei, fünf und sechs zu einer veränderten Arzneistoffresistenz gegenüber Mitoxantron und SN-38 führten, was darauf hindeutet, dass diese Aminosäurereste für die Substraterkennung von Bedeutung sind (Miwa et al., 2003). Die genauen Hintergründe der Struktur-Interaktions-Beziehung sind bisher jedoch noch nicht bekannt.

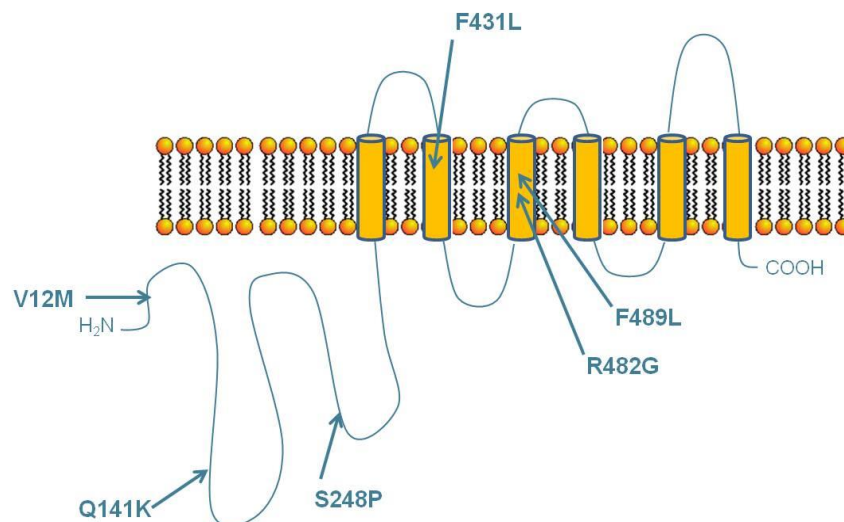
Arzneistoffe mit vor allem inhibitorischer Aktivität am BCRP sind u. a. AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten (z. B. Telmisartan), Immunsuppressiva (z. B. Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus), HIV-Proteaseinhibitoren (z. B. Saquinavir), Flavonoide (z. B. 6-Prenylchrysin), Tyrosinkinase-Inhibitoren (z. B. Imatinib), Antibiotika (z. B. Novobiocin), das Mykotoxin Fumitremorgin C (FTC) und das FTC-Analogon Ko143 (Ahmed-Belkacem et al., 2005; Allen et al., 2002; Gupta et al., 2006; Gupta et al., 2004; Houghton, 2004; Rabindran et al., 2000; Shiozawa et al., 2004; Weiss et al., 2010).

In einigen Arzneistoff-selektionierten Zellen, die den ABC-Transporter BCRP überexprimieren, ist die Aminosäure an Position 482, welche in der transmembranären  $\alpha$ -Helix drei lokalisiert ist, ausgetauscht (Abbildung 1). Die

Wildtyp-Sequenz des Transporters codiert für ein Arginin an Position 482 des BCRP-Moleküls. Mutationen dieses Bereichs können jedoch dazu führen, dass statt des Arginins Glycin, Threonin oder andere Aminosäuren an Position 482 der Aminosäuresequenz eingebaut werden (Mitomo et al., 2003). Diese Mutanten, welche häufig in Tumorzellen auftreten, zeigen eine veränderte Substratspezifität. Sie können im Gegensatz zum BCRP-Wildtyp kein Methotrexat (Tamura et al., 2006), dafür aber Rhodamin 123 und Doxorubicin transportieren (Honjo et al., 2001; Tamura et al., 2007b).

In der Nukleotidsequenz von BCRP sind verschiedene genetische Polymorphismen (Einzelnukleotid-Polymorphismen) beschrieben worden, die die Pharmakokinetik von BCRP-Substraten verändern und so die Arzneistofftherapie beeinflussen können. Die am meisten untersuchten genetischen Polymorphismen, die auch eine große Häufigkeit in verschiedenen ethnischen Populationen (z. B. Asiaten, Afrikaner und Kaukasier) aufweisen, sind BCRP Q141K und V12M (Honjo et al., 2002; Imai et al., 2002; Mizuarai et al., 2004). Q141K liegt zwischen dem Walker A-Motiv und der sogenannten ABC-Signatur, also in der Region der ATP-Bindungskassette (Abbildung 1). V12M ist an der N-terminalen intrazellulären Region lokalisiert. Die Ergebnisse von verschiedenen Arbeitsgruppen zur funktionellen Charakterisierung dieser Mutanten zeigen teilweise widersprüchliche Ergebnisse zum Einfluss der Mutationen auf Proteinexpression, Membranlokalisation und Arzneistoffresistenz (Imai et al., 2002; Kondo et al., 2004; Mizuarai et al., 2004; Morisaki et al., 2005; Tamura et al., 2007a). Eine erniedrigte Proteinexpression von Q141K im Vergleich zum BCRP-Wildtyp wurde von Imai et al. und Tamura et al. publiziert, wohingegen Morisaki et al. keine geringere Proteinexpression feststellten (Imai et al., 2002; Morisaki et al., 2005; Tamura et al., 2007a). Mizuarai et al. zeigten eine hauptsächlich intrazelluläre Lokalisation der V12M-Mutante in LLC-PK1-Zellen, während Kondo et al. eine apikale Lokalisation in LLC-PK1-Zellen nachwiesen (Kondo et al., 2004; Mizuarai et al., 2004). Weiterhin fanden Mizuarai et al. eine 10-fach niedrigere Arzneistoffresistenz gegenüber Mitoxantron oder Topotecan in LLC-PK1-Zellen, die mit der V12M-Mutante oder Q141K-Mutante transfiziert waren, im Vergleich zum BCRP-Wildtyp, wohingegen Morisaki et al. keine erniedrigte Arzneistoffresistenz der V12M-Mutante ermittelten (Mizuarai et al., 2004; Morisaki et al., 2005). Weitere potentiell klinisch relevante Mutationen der genomischen

BCRP-Sequenz, welche in Molekülbereichen der Substraterkennung und/oder dem Arzneistofftransport lokalisiert sind, sind S248P, F489L und F431L (Tamura et al., 2007b; Tamura et al., 2006). S248P ist in der Linkerregion zwischen der TMD und der NBD lokalisiert, F431L liegt in der transmembranären  $\alpha$ -Helix zwei und F489L in der transmembranären  $\alpha$ -Helix drei (Abbildung 1). Tamura et al. zeigten, dass Zellen, die diese BCRP-Mutanten überexprimieren, Methotrexat kaum oder nur marginal transportierten und im Vergleich zum BCRP-Wildtyp keine oder kaum Resistenz gegenüber Mitoxantron zeigten (Tamura et al., 2007b).



**Abbildung 1: Postulierte Struktur des BCRP-Halbtransporters und Lokalisation der untersuchten BCRP-Mutationen**

### 1.3 P-Glykoprotein (P-gp)

P-gp wurde 1976 von Juliano und Ling als erster Vertreter der ABC-Transporter-Familie überhaupt in einem resistenten Tumor von chinesischen Ovarzellen des Hamsters entdeckt (Juliano und Ling, 1976). P-gp (auch als MDR1 bekannt) ist Mitglied der ABC-Transporter-Familie ABCB und wird nach der systematischen Nomenklatur als ABCB1 bezeichnet. Neben ABCB1 besitzt die ABC-Transporter-Familie ABCB zehn weitere Mitglieder (ABCB2-ABCB11). P-gp besteht aus 1280 Aminosäuren und hat im glykosylierten Zustand ein Molekulargewicht von ca. 170 kDa. Es besteht, wie die meisten ABC-Transporter, aus zwei TMDs und zwei NBDs. Diese Domänen sind alternierend angeordnet, und die zwei homologen Hälften sind durch eine Linkerregion miteinander verbunden (Chen et al., 1986). Die Anordnung ist im Vergleich zum BCRP genau umgekehrt (Li et al., 2007): N-terminal liegt eine TMD und C-terminal eine NBD.



Wie BCRP wird P-gp pathophysiologisch häufig in Tumorzellen exprimiert und spielt dort eine Rolle bei der *Multidrug-Resistenz* gegenüber verschiedensten Chemotherapeutika (Choi, 2005). Physiologisch ist P-gp stark in der apikalen (luminalen) Membran von Intestinum, Leber, Niere und Blut-Hirn-Schranke sowie in geringerem Ausmaß in der Plazenta exprimiert (Cordon-Cardo et al., 1989; Ito et al., 2005; Thiebaut et al., 1987). Aus dem Expressionsprofil von P-gp ist ersichtlich, dass P-gp die Pharmakokinetik von verschiedenen Arzneistoffen beeinflussen kann. Im Intestinum spielt es eine Rolle bei der Limitierung der oralen Resorption von zahlreichen Arzneistoffen, da diese durch P-gp aus intestinalen Epithelzellen erneut in das Darmlumen zurücktransportiert werden (Sparreboom et al., 1997). In *mdr1a*-Knockout-Mäusen ist im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beispielsweise die orale Bioverfügbarkeit des P-gp-Substrats Paclitaxel erheblich erhöht (Sparreboom et al., 1997). Bei einer Hemmung von P-gp durch die Gabe eines P-gp-Inhibitors kann es somit auch zu einer erhöhten oralen Bioverfügbarkeit eines P-gp-Substrats kommen. In der Leber und der Niere ist P-gp an der Exkretion von Arzneistoffen beteiligt. Der P-gp-Inhibitor Chinidin erniedrigte die renale und biliäre Exkretion des P-gp-Substrats Digoxin (Angelin et al., 1987). An der Blut-Hirn-Schranke begrenzt P-gp den Eintritt von P-gp-Substraten in das ZNS. Das Opioid Loperamid, welches ein P-gp-Substrat ist und bei Diarrhoe eingesetzt wird, führt nicht zu Opioid-bedingten zentralen Nebenwirkungen wie Atemdepression, da P-gp Loperamid aus dem ZNS in die Peripherie transportiert (Sadeque et al., 2000). Bei einer In-vivo-Inhibition von P-gp durch Chinidin kann Loperamid nicht oder nur unzureichend durch P-gp aus dem ZNS heraustransportiert werden, was zu Atemdepression bei den behandelten Patienten führen kann (Sadeque et al., 2000). In der Plazenta schützt P-gp den Fötus vor schädlichen Substanzen, indem es den Eintritt dieser Substanzen in den fötalen Kreislauf reduziert. Smit et al. zeigten eine erhöhte fetale Akkumulation der P-gp-Substrate Digoxin, Saquinavir und Paclitaxel in *mdr1a/b*-Knockout-Mäusen (Smit et al., 1999).

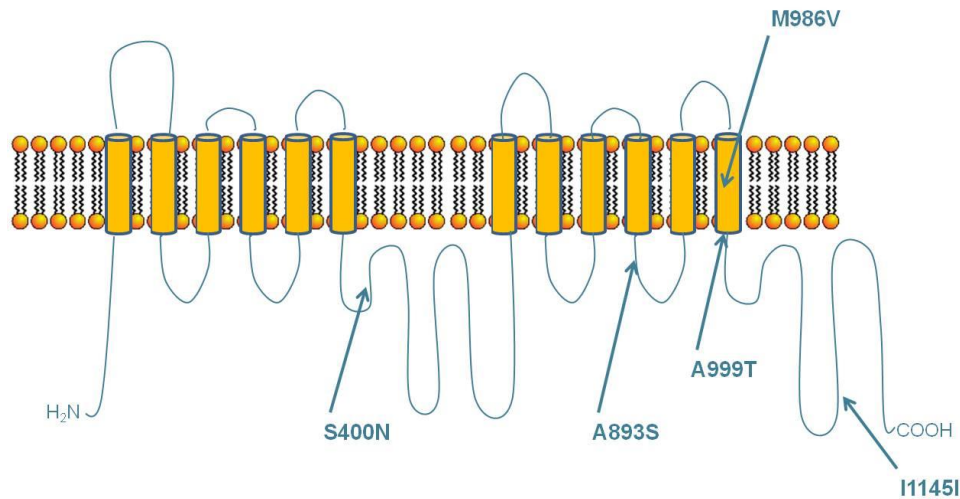
P-gp verfügt über eine sehr breite Substratspezifität und transportiert neben zahlreichen Zytostatika (z. B. Doxorubicin, Mitoxantron) u. a. auch HIV-Proteaseinhibitoren (z. B. Saquinavir), Herzglykoside (z. B. Digoxin), Immunsuppressiva (z. B. Ciclosporin A), Steroide (z. B. Dexamethason), Statine (z. B. Atorvastatin), Calciumkanalblocker (z. B. Verapamil) und  $AT_1$ -Rezeptorantagonisten (z. B.

Losartan) (Fromm, 2002; Kim et al., 1998; Pauli-Magnus et al., 2000; Schinkel et al., 1995; Soldner et al., 2000; Wu et al., 2000). Die Substrate sind gewöhnlich hydrophob, haben eine molekulare Masse zwischen 300 und 2000 Da und besitzen strukturell meistens zwei planare aromatische Domänen und ein Stickstoffatom (Ueda et al., 1997). Studien mit P-gp-Mutanten haben dargelegt, dass Mutationen, die die Substraterkennung und -bindung von P-gp beeinflussen, hauptsächlich in den transmembranären  $\alpha$ -Helices fünf, sechs (erste TMD) und elf, zwölf (zweite TMD) zu finden sind (Ambudkar et al., 1999). Substitutionen an Phenylalanin-335 zu Alanin in der transmembranären  $\alpha$ -Helix sechs und an Phenylalanin-978 zu Alanin in der transmembranären  $\alpha$ -Helix zwölf verändern die Substratspezifität des Proteins. Zellen, welche die F335A-Mutante des P-gp exprimierten, zeigten im Vergleich zum Wildtyp keinen oder nur einen geringen Schutz gegenüber der zytotoxischen Aktivität von Vinblastin und Actinomycin D, während Zellen, welche die F978A-Variante des P-gp exprimierten, hingegen keine oder kaum Resistenz gegenüber Colchicin und Adriamycin aufwiesen (Loo und Clarke, 1993). Eine Substitution von Serin-941 zu Phenylalanin in der transmembranären  $\alpha$ -Helix elf führte zu einem Verlust der Resistenz-vermittelnden Wirkung des P-gp gegenüber Adriamycin und Colchicin (Gros et al., 1991).

Die *Multidrug-Resistenz* von Tumorzellen gegenüber Zytostatika wird unter anderem durch die Überexpression von P-gp vermittelt (Thomas und Coley, 2003). Diese *Multidrug-Resistenz* kann durch Inhibitoren von P-gp überwunden werden. Erste Studien zur Suche nach P-gp-Inhibitoren wurden mit Substanzen durchgeführt, die bereits für andere Indikationen eingesetzt wurden, z. B. Calciumkanalblocker wie Verapamil und Immunsuppressiva wie Ciclosporin A (Neumann et al., 1992; Tsuruo et al., 1982). Sie wurden als Inhibitoren der ersten Generation bezeichnet. Für die P-gp-Hemmung in vivo sind hohe Konzentrationen nötig, so dass der Versuch einer therapeutischen Hemmung von P-gp mit erheblicher systemischer Toxizität assoziiert ist (Krishna und Mayer, 2000). Im Rahmen der Suche nach nicht-toxischen Inhibitoren der zweiten Generation wurden Analoga oder Stereoisomere von Substanzen der ersten Inhibitor-Generation evaluiert, welche zudem potenter waren als ihre Vorgänger (Krishna und Mayer, 2000). Vertreter der zweiten Generation waren z. B. das Verapamil-Derivat Dex-Verapamil (*R*-Enantiomer von Verapamil) und das Ciclosporin A-Analogon PSC 833 (Valspodar) (Boesch et al., 1991; Pirker et al.,

1990). Das Problem der Inhibitoren der zweiten Generation war, dass sie bei einer gleichzeitigen Gabe mit Zytostatika deren Pharmakokinetik und Verteilung beeinflussten (Krishna und Mayer, 2000). Deshalb wurden Inhibitoren der dritten Generation entwickelt, die bereits bei nanomolaren Konzentrationen inhibitorische Effekte in vivo zeigen und in Kombination mit Zytostatika gegeben werden können. Zu den bekannten Vertretern der dritten Generation gehören u. a. Elacridar (GF120918) und Tariquidar (XR9576) (Hyafil et al., 1993; Martin et al., 1999). Die Inhibitoren der dritten Generation wurden und werden in klinischen Studien untersucht, aber diese Studien haben bisher keine Verbesserung der therapeutischen Effizienz begleitend verabreichter Zytostatika nachweisen können (Palmeira et al., 2012).

Auch in der genomischen Sequenz des P-gp sind genetische Polymorphismen (Einzelnukleotid-Polymorphismen) beschrieben worden, die sich auf die Expression, zelluläre Lokalisation bzw. Funktion des ABC-Transporters auswirken und somit die Pharmakokinetik von P-gp-Substraten beeinflussen können. Hoffmeyer et al. beschrieben für die synonyme Mutante I1145I, die in der zweiten NBD liegt (Abbildung 2), eine erniedrigte duodenale Expression des ABC-Transporters und eine veränderte Pharmakokinetik des P-gp-Substrats Digoxin (Hoffmeyer et al., 2000). Diese Mutante tritt häufig im Haplotyp mit einer weiteren Mutation, A893S, auf (Kim et al., 2001). Auch die Mutante A893S, die in der Region der zweiten TMD lokalisiert ist (Abbildung 2), kann prinzipiell die Pharmakokinetik des P-gp-Substrats Digoxin beeinflussen. HEK293-Zellen, die die Mutante A893S exprimierten, wiesen einen verstärkten Efflux von Digoxin auf (Kim et al., 2001). Die Mutante S400N, die sich in der ersten NBD befindet (Abbildung 2), war im Vergleich zum Wildtyp mit einem reduzierten Efflux des P-gp-Substrats Rhodamin 123 in LLC-PKI-Zellen assoziiert (Woodahl et al., 2004). Aus der Lokalisation der P-gp-Mutanten A999T und M986V in der transmembranären  $\alpha$ -Helix zwölf (zweite TMD) (Abbildung 2), die an der Arzneistoffbindung beteiligt ist, kann auch bei diesen beiden Mutanten eine Beeinträchtigung der Transporterfunktion angenommen werden, d. h. die Substratspezifität des Proteins könnte verändert sein.



**Abbildung 2: Potentielle Struktur des P-gp-Moleküls und Position der untersuchten P-gp-Mutationen**

## 1.4 Telmisartan

Telmisartan ist ein kompetitiver AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist, der in Deutschland 1999 eine Zulassung zur Behandlung der arteriellen Hypertonie erhalten hat. Seit 2009 ist Telmisartan auch zur kardiovaskulären Prävention bei kardiovaskulären Risikopatienten zugelassen (European Medicines Agency, 2012). Zu diesen zählen Patienten mit manifesten kardiovaskulären Erkrankungen, z. B. koronarer Herzkrankheit oder Schlaganfall, oder Typ-2-Diabetes mellitus mit dokumentiertem Endorganschaden. Die ONTARGET-Studie (The **O**ngoing **T**elmisartan **A**lone and in Combination with **R**amipril **G**lobal **E**ndpoint **T**rial) hatte gezeigt, dass Telmisartan den kombinierten primären Endpunkt (Herz-Kreislauf-Tod, Herzinfarkt, Schlaganfall oder Krankenhauseinweisung wegen Herzschwäche) bei Patienten mit einer bekannten Herz-Kreislauf-Erkrankung oder einem Diabetes mellitus mit Endorganschaden genauso effektiv reduzierte wie der ACE-Hemmer Ramipril (Yusuf et al., 2008).

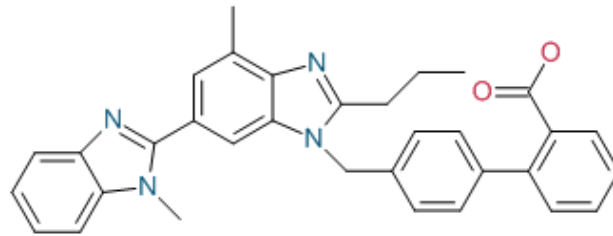
Telmisartan wird häufig in einer antihypertensiven Kombinationstherapie eingesetzt. Insbesondere kardiovaskuläre Risikopatienten bekommen häufig mehrere Pharmaka, so dass klinisch relevante Arzneistoffinteraktionen auftreten können. Um Arzneistoffinteraktionen möglichst zu vermeiden, ist es wichtig, das Interaktionspotential von Telmisartan zu charakterisieren. Da die Interaktion von Telmisartan mit ABC-Transportern nicht genau erfasst war, wurde seine Interaktion mit den ABC-Transportern BCRP und P-gp in der vorliegenden Arbeit *in vitro* untersucht.

Vergangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass Telmisartan in vitro ein potenter Inhibitor von P-gp ist (Weiss et al., 2010). Im Rahmen einer klinische Studie in gesunden männlichen Probanden, die entweder eine Kombinationstherapie von Telmisartan (120 mg) und dem bekannten P-gp-Substrat Digoxin oder eine Digoxin-Monotherapie erhielten, konnte nachgewiesen werden, dass Telmisartan die maximale Plasmakonzentration ( $C_{\max}$ ) von Digoxin signifikant erhöhte (Stangier et al., 2000b). Eine Zunahme der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) um 22 % und der  $C_{\max}$  um 50 % legt die Vermutung nahe, dass die P-gp-Hemmung durch Telmisartan auch in vivo relevante Folgen haben kann.

Außerdem zeigten unsere Ergebnisse, dass Telmisartan in vitro ein Inhibitor von BCRP ist (Weiss et al., 2010). Hierbei konnte für Telmisartan ein  $IC_{50}$ -Wert von  $16,9 \pm 8,1 \mu\text{M}$  ermittelt werden, wohingegen der potente BCRP-Inhibitor FTC einen  $IC_{50}$ -Wert von  $0,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$  aufweist (Weiss et al., 2010). Klinische Studien, die eine Interaktion von Telmisartan mit BCRP-Substraten untersuchen, gibt es bislang noch nicht. Die Ergebnisse unserer In-vitro-Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass Arzneistoffinteraktionen bei einer Kombinationstherapie von Telmisartan mit BCRP-Substraten möglich sind (Weiss et al., 2010).

Wechselwirkungen von Telmisartan mit anderen Arzneistoffen können somit auf der Ebene von ABC-Transportern stattfinden, aber auch auf der Ebene von Aufnahmetransportern, da Telmisartan auch mit diesen Transportern interagiert (Ishiguro et al., 2006). Eine Interaktion von Telmisartan mit dem Dihydropyridin-Calciumkanalblocker Nisoldipin wurde von Bajcetic et al. beschrieben (Bajcetic et al., 2007). Die gleichzeitige Gabe von Telmisartan und Nisoldipin erhöhte die Bioverfügbarkeit von Telmisartan. Der genaue Mechanismus dieser Interaktion ist bisher unklar. Eine gemeinsame Phase-I-Biotransformation liegt jedoch vermutlich nicht vor, da Nisoldipin extensiv über die Cytochrom P450-Oxidase CYP3A4 verstoffwechselt wird, während Telmisartan kein Substrat von CYP3A4 darstellt (Stangier et al., 2000a). Eventuell sind bei dieser Interaktion daher die ABC-Transporter P-gp und BCRP beteiligt.

Chemisch gesehen besitzt Telmisartan eine Benzimidazol-Struktur mit heteroaromatischen Substituenten. Der IUPAC-Name lautet 4'-[(1, 4'-dimethyl-2'-propyl[2,6'-bi-1H-benzimidazol]-1'-yl)methyl]-[1,1'-biphenyl]-2-carbonsäure (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Struktur von Telmisartan, MW: 514,63 g/mol**

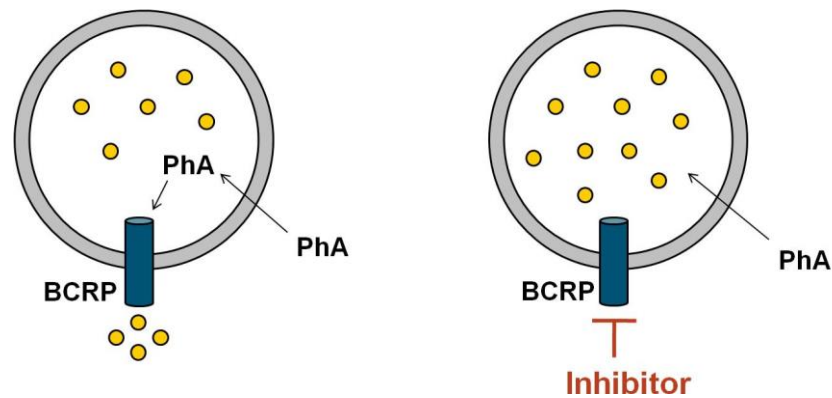
Der n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (log P) von 3,2 zeigt, dass Telmisartan eine hohe Lipophilie aufweist. Diese spiegelt sich auch in einem hohen Verteilungsvolumen von ca. 500 l wider, dem höchsten Verteilungsvolumen in der Gruppe der AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten (Stangier et al., 2000c).

Die verfügbaren pharmakokinetischen Daten stammen hauptsächlich von Patienten mit geringem bis mäßig erhöhtem Bluthochdruck sowie gesunden Probanden. Der Wirkstoff wird nach oraler Applikation rasch resorbiert und erreicht den maximalen Plasmaspiegel innerhalb von einer Stunde (Stangier et al., 2000a). Die Bioverfügbarkeit ist dosisabhängig (Stangier et al., 2000c). Dies ist wahrscheinlich auf eine sättigbare intestinale und hepatische First-Pass-Eliminierung durch Glucuronidierung zurückzuführen. Bei der Glucuronidierung durch die UDP-Glucuronyl-Transferasen entsteht der pharmakologisch inaktive Metabolit 1-O-Acylglucuronid (Stangier et al., 2000a). Eine Phase-I-Biotransformation durch Cytochrom P450-Isoenzyme ist bislang nicht beschrieben worden (Deppe et al., 2010; Stangier et al., 2000a). Telmisartan wird fast ausschließlich über den Fäzes und nur zu einem kleinen Anteil von weniger als 1 % über die Niere eliminiert (Stangier et al., 2000a). Die Plasma-Halbwertszeit von ca. 20-24 h ist die längste in der Klasse der AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten und ermöglicht eine einmal tägliche Gabe von Telmisartan (Battershill und Scott, 2006). Ein weiteres wichtiges Charakteristikum von Telmisartan ist seine hohe Plasmaproteinbindung von 99,5 %. Dabei bindet Telmisartan hauptsächlich an Serumalbumine, aber auch zu geringen Anteilen an das saure  $\alpha$ -1-Glykoprotein,  $\gamma$ -Globulin und Lipoproteine (Stangier et al., 2000c).

### **1.5 Fluoreszenzbasierte Assays zur Untersuchung der Funktionalität von ABC-Transportern**

Eine Möglichkeit, die Funktionalität von ABC-Transportern bzw. die Hemmung der ABC-Transporter-Funktion durch Arzneistoffe zu messen, sind Efflux-Assays, bei denen die zelluläre Akkumulation fluoreszierender ABC-Transporter-Substrate detektiert und so indirekt auf die ABC-Transporter-Funktion rückgeschlossen werden kann (Sarkadi et al., 2006). Für diese Untersuchungen werden zum einen Zellen benötigt, die den ABC-Transporter exprimieren, und zum anderen Kontrollzellen, die diesen nicht enthalten. ABC-Transporter-exprimierende Zellen pumpen Substrate aus der Zelle heraus, so dass deren Konzentration in den Zellen sinkt. In Anwesenheit eines Inhibitors oder eines konkurrierenden Substrats steigt die Akkumulation der Substrate wieder an. Dies kann bis zu dem Niveau geschehen, das ohne ABC-Transporter-Expression beobachtet wird.

Jonker et al. haben herausgefunden, dass Pheophorbid A (PhA), ein Abbauprodukt des Chlorophylls, ein spezifisches, fluoreszierendes Substrat von BCRP ist (Jonker et al., 2002; Robey et al., 2004). Der Transport von PhA durch BCRP kann genutzt werden, um die BCRP-Funktion zu untersuchen (Robey et al., 2004). PhA durchdringt die Zellmembran durch passive Diffusion und akkumuliert im Zellinneren. BCRP kann PhA wieder aus dem Zellinneren heraustransportieren, so dass dessen Konzentration und somit auch die PhA-Fluoreszenzintensität im Zellinneren deutlich absinken. Die PhA-Fluoreszenzintensität kann im Durchflusszytometer detektiert werden (Exzitationsmaximum bei 408 nm und Emissionsmaximum bei 669 nm). Bei Zugabe eines BCRP-Inhibitors, wie z. B. Telmisartan, kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Abschwächung des PhA-Effluxes und somit zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität (Abbildung 4) (Weiss et al., 2010).

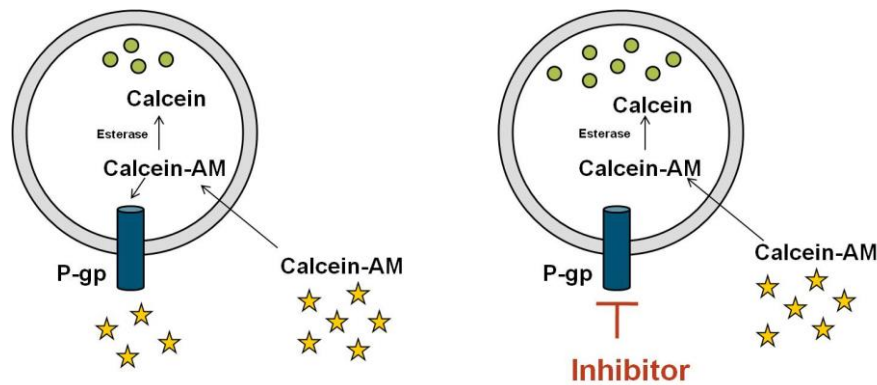


**Abbildung 4: Schematische Darstellung der intrazellulären Akkumulation des BCRP-Substrats PhA in BCRP-exprimierenden Zellen in An- (rechts) bzw. Abwesenheit (links) eines BCRP-Inhibitors**

Ein ideales Substrat für den ABC-Transporter P-gp stellt Calceinacetoxymethylester (Calcein-AM) dar (Homolya et al., 1993). Calcein-AM ist ein lipophiles, nicht fluoreszierendes Substrat von P-gp (Holló et al., 1994). Aufgrund seiner Lipophilie kann es rasch durch die Zellmembran in die Zelle diffundieren. Bei Eintritt in das intrazelluläre Milieu spalten zytoplasmatische, nicht-spezifische Esterasen Calcein-AM zur fluoreszierenden, hydrophilen freien Säure Calcein (Holló et al., 1994). Diese ist kein Substrat von P-gp, so dass sie sich in der Zelle anreichert und nicht von P-gp aus der Zelle heraustransportiert werden kann (Holló et al., 1994; Homolya et al., 1993).

Zellen, die P-gp exprimieren, transportieren Calcein-AM aus der Zelle heraus, bevor es gespalten werden kann und verhindern so die Akkumulation von Calcein (Weiss et al., 2003). Bei Zugabe eines P-gp-Inhibitors wird Calcein-AM nicht von P-gp aus der Zelle heraustransportiert, es wird durch Esterasen in Calcein gespalten und dadurch steigt die intrazelluläre Fluoreszenz des Calceins. Je stärker die Interaktion zwischen Inhibitor und P-gp ist, desto stärker ist der Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz des Calceins. Das Funktionsprinzip des Calcein-AM-Assays in An- und Abwesenheit eines P-gp-Inhibitors ist in Abbildung 5 dargestellt.





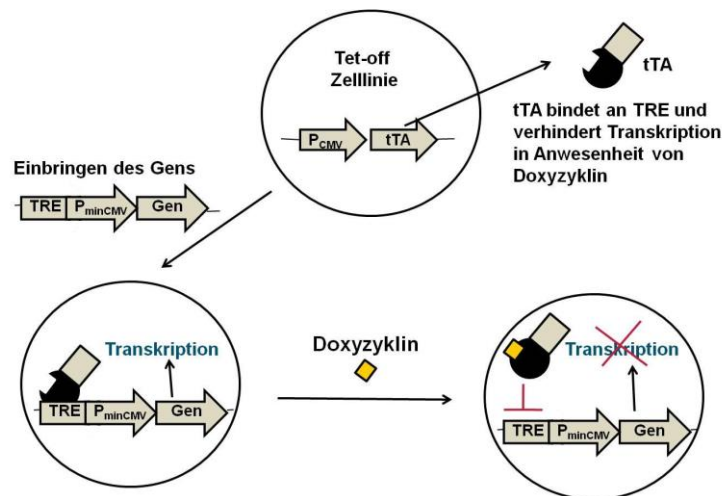
**Abbildung 5: Schematische Darstellung der intrazellulären Akkumulation von Calcein in An- (rechts) bzw. Abwesenheit (links) eines P-gp-Inhibitors**

## 1.6 Das Tet-System

Das Tet-System ist ein zelluläres Expressionssystem, welches durch Doxzyklin reprimierbar bzw. induzierbar ist. Es basiert auf einem prokaryotischen Mechanismus, dem Tetrazyklin-Resistenzoperon aus *E.coli* (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). Die Zielgene werden durch die Tetrazyklin-Operator-Sequenz (tetO) kontrolliert, welche an einen Tetrazyklin-Repressor (TetR) gebunden ist. Bei Bindung eines Tetrazyklin-Metall-Komplexes an den Tetrazyklin-Repressor dissoziiert dieser vom Operator und es erfolgt die Transkription der Zielgene (Hillen und Berens, 1994).

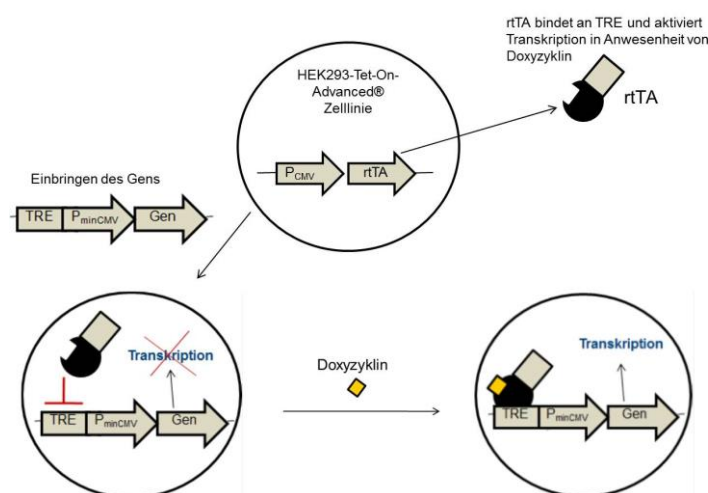
Für die Anwendung dieses prokaryotischen Systems in eukaryotischen Zellen wurde der Tetrazyklin-Repressor mit der C-terminalen VP16-Aktivierungsdomäne des Herpes-simplex-Virus fusioniert, so dass statt einem Repressor ein Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator (tTA) hergestellt wurde (Gossen und Bujard, 1992). Die Genexpression des Zielgens steht unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-abhängigen Elements (TRE), welches aus sieben Kopien der tetO-Sequenzen und einem minimalen CMV-Promotor besteht. Eine Aktivierung der Genexpression findet statt, wenn der Tetrazyklin-abhängige Transaktivator an das Tetrazyklin-abhängige Element bindet (Baron und Bujard, 2000). Es gibt zwei verschiedene Tet-Systeme, nämlich das Tet-Off- und das Tet-On-System. Bei der Tet-Off-Variante bindet der Tetrazyklin-abhängige Transaktivator in Abwesenheit von Tetrazyklin-Derivaten, wie z. B. Doxzyklin, an das Tetrazyklin-abhängige Element, und die Transkription des Zielgens wird induziert (Baron und Bujard, 2000). Bei Zugabe von Tetrazyklin-

Derivaten kann der Tetrazyklin-abhängige Transaktivator nicht an das Tetrazyklin-abhängige Element binden und die Transkription wird blockiert (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Tet-Off-Systems (adaptiert vom Clontech Tet-Off® und Tet-On® Gene Expression Systems User Manual)<sup>1</sup>**

Bei der Tet-On-Variante wird durch Austausch von vier Aminosäuren im Tetrazyklin-Repressor die Bindungscharakteristik so verändert, dass ein „reverser“ Transaktivator (rtTA) entsteht (Gossen et al., 1995). Dieser benötigt eine Tetrazyklin-Derivat-vermittelte Konformationsänderung, um an das Tetrazyklin-abhängige Element binden zu können, und aktiviert deshalb die Transkription in Anwesenheit von z. B. Doxzyklin (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Tet-On-Systems (adaptiert vom Clontech Tet-Off® und Tet-On® Gene Expression Systems User Manual)<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Clontech Laboratories. Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems User Manual, 2005. Accessed 6 September 2012.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war (1) die Etablierung eines experimentellen Systems für die konditionale Expression der ABC-Transporter BCRP und P-gp, (2) die Generierung von klinisch relevanten Mutanten (Einzelnukleotid-Polymorphismen, somatische Mutationen) der beiden ABC-Transporter durch *Site-Directed-Mutagenesis*, (3) die Untersuchung der Mutanten im Hinblick auf Expressionsniveau und zelluläre Verteilung in HEK293-Tet-On-Zellen sowie (4) die Analyse der Interaktion der Erstlinien-Antihypertensiva Telmisartan und Nisoldipin mit den genannten ABC-Transportern und ihren Mutanten.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte ein zelluläres System etabliert werden, das eine Doxyzyklin-abhängige Expression der ABC-Transporter BCRP und P-gp erlaubte. Hierfür sollten zunächst Responderkonstrukte kloniert werden, welche die *Open Reading Frame* der ABC-Transporter BCRP und P-gp bzw. der Reporter-Gene AcGFP1 (*Aequorea coerulescens Green Fluorescent Protein 1*) oder tdTomato jeweils unter der Kontrolle eines bidirektionalen TRE-Promoters enthielten (BCRP/AcGFP1; P-gp/tdTomato). Parallel sollten mittels stabiler Transfektion HEK293-Zellen generiert werden, die den Tet-Off-Transaktivator stabil exprimieren. Zudem sollten HEK293-Tet-On-Zellen evaluiert werden, welche rtTA stabil exprimieren. In diese Zellen sollten mittels transienter Transfektion die klonierten Responderkonstrukte von BCRP eingebracht und die Doxyzyklin-abhängige Repression (HEK293-Tet-Off-Zellen) bzw. Induktion (HEK293-Tet-On-Zellen) der BCRP-Expression auf RNA- und Protein-Ebene analysiert werden.

Folgende Fragen standen zudem im Vordergrund:

1. Welche Doxyzyklin-Konzentration ist zur Aktivierung bzw. Inaktivierung des Tet-Off- bzw. Tet-On-Systems nötig?
2. Ist der exprimierte ABC-Transporter BCRP funktional und zeigen pharmakologische Inhibitoren im gewählten System auch tatsächlich einen inhibitorischen Effekt?

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten (1) klinisch relevante Mutanten (Einzelnukleotid-Polymorphismen und somatische Mutationen) des ABC-Transporters BCRP durch *Site-Directed-Mutagenesis* der etablierten Responderkonstrukte erzeugt und durch Sequenzierung verifiziert werden, (2) das

Expressionsniveau und die membranständige Lokalisation des Transporters in Tet-On-Zellen überprüft und (3) der Einfluss genetischer Variabilität auf die Interaktion von BCRP mit Telmisartan bzw. Nisoldipin mittels fluoreszenzbasierter Assays in transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen analysiert werden.

Folgenden weiteren Fragen sollte nachgegangen werden:

1. Sind die Proteinexpression und die mRNA-Expression der BCRP-Mutanten im Vergleich zum BCRP-Wildtyp verändert? Bleibt die membranständige Lokalisation erhalten?
2. Beeinflusst die Bindung von Telmisartan an Plasmaproteine die inhibitorische Wirkung des Telmisartans auf BCRP?

Im dritten Teil dieser Arbeit sollten die klonierten Responderkonstrukte von P-gp mittels transienter Transfektion in HEK293-Tet-On-Zellen eingebracht werden. In diesen Zellen sollte dann, ähnlich den Arbeiten zum ABC-Transporter BCRP, zunächst die Doxzyklin-abhängige Induktion der P-gp-Expression auf Protein-Ebene analysiert werden. Anschließend sollten (1) klinisch relevante Mutanten (Einzelnukleotid-Polymorphismen und somatische Mutationen) des ABC-Transporters P-gp durch *Site-Directed-Mutagenesis* der etablierten Responderkonstrukte erzeugt und durch Sequenzierung verifiziert werden, (2) das Expressionsniveau von P-gp-Wildtyp und den generierten P-gp-Mutanten in Tet-On-Zellen überprüft und (3) das bei BCRP verwendete Konzept zur Untersuchung der Interaktion mit ABC-Transportern bei P-gp erprobt werden. Dazu sollte mittels fluoreszenzbasiertem Assay der Einfluss genetischer Variabilität auf die Interaktion von P-gp mit Telmisartan bzw. Nisoldipin in transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen analysiert werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Substanzen

Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Albumin bovine Fraction V pH 7	Serva (Heidelberg)
Albumin Fraction V (pH 7) blotting grade	Applichem (Darmstadt)
Albumin from human serum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calcein-AM	MoBiTec (Göttingen)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Applichem (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
Doxyzyklin	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
EDTA	Applichem (Darmstadt)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Essigsäure (96 %)	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Fumitremorgin C	Tebu-Bio (Offenbach)
G418-Sulfat	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
Glucose	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Hygromycin	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)

Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Applichem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Merck(Darmstadt)
Nisoldipin	Sequoia (Berkshire, UK)
Nonidet P40	Applichem (Darmstadt)
PBS Dulbecco w/o $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	Biochrom AG (Berlin)
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roth (Karlsruhe)
Pheophorbid A	Frontier Scientific (Utah, USA)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Roti <sup>®</sup> -Histofix 4 %	Roth (Karlsruhe)
Telmisartan	Sequoia (Berkshire, UK)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanacetat	Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl = TRIS	Roth (Karlsruhe)
Triton <sup>®</sup> X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trizol	Life Technologies (Darmstadt)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Merck (Darmstadt)
Verapamilhydrochlorid	Sequoia (Berkshire, UK)
Xylencyanol	Roth (Karlsruhe)

### 3.1.2 Lösungen und Puffer

Acryl-/Bisacrylamid-Lösung	Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (Roth, Karlsruhe)
Bromphenolblaupuffer	50 mM TRIS, 1 % SDS ( <i>m/V</i> ), 100 mM DTT, 30 % Glycerol, 0,02 % Bromphenolblau ( <i>m/V</i> ), pH 7,0

Blocking-Lösung (Immunfluoreszenzfärbung)	5 % Ziegenserum, 1 % BSA, 0,2 % Triton <sup>®</sup> X-100 in TBS-Puffer
Milchpulverlösung (Immunoblot)	5 % Milchpulver ( <i>m/V</i> ) in TBST
Bradford-Reagenz	Roti <sup>®</sup> Quant (Roth, Karlsruhe)
CaCl <sub>2</sub> -Glycerin-Lösung	100 mM CaCl <sub>2</sub> , 20 %ige Glycerinlösung ( <i>m/V</i> ) in Wasser
Cell-Lysis-Puffer (10×) # 9803	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA , 1 mM EGTA, 1 % Triton, 2.5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM beta-glycerophosphat, 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 1 µg/ml Leupeptin von Cell Signaling (Distribution durch NEB, Frankfurt am Main)
Dako antibody diluent	Dako North America (Kalifornien, USA)
6 × DNA-Probenpuffer	10 mM TRIS, 60 mM EDTA, 60 % Glycerin (V/V), 0,03 % Bromphenolblau ( <i>m/V</i> ), 0,03 % Xylencyanol ( <i>m/V</i> ), pH 7,6
DNA-Größenstandard	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Fermentas (St. Leon-Rot)
LB-Agar	LB Medium + 1,5 % Agar ( <i>m/V</i> )
LB-Medium	1 % Trypton ( <i>m/V</i> ), 0,5 % Hefeextrakt ( <i>m/V</i> ), 1 % NaCl ( <i>m/V</i> ), pH 7,0

Minipräp-Lösung I	50 mM Glucose, 25 mM TRIS, 10 mM EDTA, 600 µg/ml Lysozym, 10 mg/ml RNase A pH 8,0 (Lysozym und RNase A wurden immer frisch zugegeben)
Minipräp-Lösung II	200 mM NaOH, 1 % SDS (m/V)
Minipräp-Lösung III	3 M Kaliumacetat, 12 % Essigsäure (V/V)
Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat, pH 4,8
Ponceau S Färbelösung	0,5 % Ponceau S (m/V), 1 % Eisessig (V/V)
Proteinstandard	PageRuler™ Prestained Protein Ladder Fermentas (St. Leon-Rot)
6 %iges Sammelgel (pro Gel)	1,45 ml Reinstwasser, 2,5 ml 2 × Sammelgelpuffer, 1 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid-Lösung, 3 µl TEMED, 60 µl 10 %ige (m/V) APS-Lösung in Reinstwasser
2 × Sammelgelpuffer	250 mM TRIS, 0,2 % SDS (m/V), pH 6,8
10 × SDS-Laufpuffer	250 mM TRIS, 1,92 M Glycin, 1 % SDS (m/V), pH 8,3-8,8
2 × SDS-Probenpuffer	50 mM TRIS, 1 % SDS (m/V), 100 mM DTT, 30 % Glycerol (V/V), pH 7,0
SOC-Medium	1 % Trypton (m/V), 0,5 % Hefeextrakt (m/V), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose



TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)	40 mM TRIS-Acetat, 0,1 mM EDTA, pH 8,0
TBS-Puffer	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7.4
10 × TBST	1,5 M NaCl, 100 mM TRIS, 1 % Tween 20 (V/V)
10 × Transferpuffer	250 mM TRIS, 1,92 M Glycin, 0,2 % SDS (m/V), pH 8,3
10 %iges Trenngel (pro Gel)	3 ml Reinstwasser, 1,875 ml 4 × Trenngelpuffer, 2,5 ml 30 % Acryl-/Bisacrylamid-Lösung, 7,5 µl TEMED, 75 µl 10 %ige (m/V) APS-Lösung in Reinstwasser
4 × Trenngelpuffer	1,5 M TRIS, 0,4 % SDS (m/V), pH 8,8
Trypsin/EDTA (1×)	PAA (Cölbe)

### 3.1.3 DNA und Vektoren

Lego T2	Dr. Kristoffer Weber (UKE, Hamburg)
pCMV6-XL5-BCRP	Origene (Darmstadt)
pTet-Off	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
pTet-On-Advanced Vektor	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
pTRE-Tight-BI-AcGFP1	Clontech (Saint-Germain-en-Laye, F)
pHaMDRwt	addgene (Cambridge, USA)

### 3.1.4 Enzyme und Reagenziensysteme

jetPRIME™	Peqlab (Erlangen)
Lumi-Light <sup>Plus</sup> Western-Blot Substrat	Roche (Mannheim)
Lysozym	Sigma (Deisenhofen)
PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kit	Life Technologies (Darmstadt)

QuikChange <sup>®</sup> Lightning Site-Directed-Mutagenesis Kit	Agilent Technologies (Waldbronn)
RevertAid <sup>™</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase A	Sigma (Deisenhofen)
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionsendonukleasen	NEB und Fermentas

### 3.1.5 Antikörper

Anti-Rabbit IgG HRP-linked Antikörper	Cell Signaling (Distribution durch NEB, Frankfurt am Main)
Anti-Mouse (H+L) HRP	Cell Signaling (Distribution durch NEB, Frankfurt am Main)
Anti-Mouse IgG (whole molecule) R-PE	Sigma- Aldrich (Taufkirchen)
Mouse Anti-BCRP Antikörper (BXP-21)	Enzo Life Sciences (Lörrach)
Mouse Anti-P-Glykoprotein Antikörper	Abcam (Cambridge, UK)
Mouse TetR Monoclonal Antibody	Clontech (Saint-Germain-en- Laye, F)
Rabbit Anti-Actin Antikörper	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

### 3.1.6 Zellen

#### 3.1.6.1 Eukaryotische Zellen

HEK293-Zellen (ATCC<sup>®</sup>-Nummer: CRL-1573)  
 HEK293-Tet-On<sup>®</sup>-Advanced-Zellen (Clontech 630930)  
 MDCKII-par-Zellen (ATCC<sup>®</sup>-Nummer: CRL-2936)  
 MDCKII-BCRP-Zellen (freundlicherweise von Herrn Dr. Piet Borst und Herrn Dr. Alfred Schinkel (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) zur Verfügung gestellt)

**3.1.6.2 Bakterienstämme**

One Shot® TOP 10 kompetente Zellen

Life Technologies (Darmstadt)

XL10- Gold ultrakompetente Zellen

Agilent Technologies  
(Waldbronn)**3.1.7 Zellkulturmedien und Zusätze**

Amphotericin B

Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

DMEM mit 4,5 g/l Glucose

PAA (Cölbe)

RPMI 1640

PAA (Cölbe)

Fetales Rinderserum (FBS)

PAA (Cölbe)

Pen/Strep

PAA (Cölbe)

Normal Goat Serum

Cell Signaling (Distribution  
durch NEB, Frankfurt am Main)**3.1.8 Primersequenzen für die Site-Directed-Mutagenesis*****BCRP F431L (T1291C)***for: 5` CAGAGCTGGGGTTCTCCTCTTCTGACGACCAAC 3`rev: 5` GTTGGTCGTCAGGAAGAGGAGAACCCCAGCTCTG 3`***BCRP F489L (T1465C)***for: 5` GGATGTTACCAAGTATTATACTTACCTGTATAGTGTACTTC 3`rev: 5` GAAGTACACTATACAGGTAAGGTATAATACTTGGTAACATCC 3`***BCRP Q141K (C421A)***for: 5` GACGGTGAGAGAAAACCTTAAAGTTCTCAGCAGCTCTTC 3`rev: 5` GAAGAGCTGCTGAGAACTITAAGTTTTCTCTCACCGTC 3`***BCRP R482G (A1444G)***for: 5` GATTTATTACCCATGGGGATGTTACCAAGT 3`rev: 5` ACTTGGTAACATCCCCATGGGTAATAAATC 3`***BCRP S248P (T742C)***for: 5` CATTTCATCAGCCTCGATATCCCATCTTCAAGTTGTTTG 3`rev: 5` CAAACAACCTGAAGATGGGATATCGAGGCTGATGAATG 3`***BCRP V12M (G34A)***for: 5` GTCGAAGTTTTTATCCCAATGTCACAAGGAAACACC 3`rev: 5` GGTGTTTCCTTGTGACATTGGGATAAAAACTTCGAC 3`

***P-gp A893S (G2677T)***for: 5` GAAAGAACTAGAAAGGTTCTGGGAAGATCGCTAC 3`rev: 5` GTAGCGATCTTCCCAGAACCTTCTAGTTCTTTC 3`***P-gp A999T (G2995A)***for: 5` GTTCATTTGCTCCTGACTATACCAAAGCCAAAATATCAGC 3`rev: 5` GCTGATATTTTGGCTTTGGTATAGTCAGGAGCAAATGAAC 3`***P-gp G412G (T1236C)***for: 5` GTTAAGATCTTGAAGGGCCTGAACCTGAAGGTGC 3`rev: 5` GCACCTTCAGGTTCAAGGCCCTTCAAGATCTTAAC 3`***P-gp I1145I (C3435T)***for: 5` GTCACAGGAAGAGATTGTGAGGGCAGCAAAG 3`rev: 5` CTTTGCTGCCCTCACAATCTCTTCCTGTGAC 3`***P-gp M986V (A2956G)***for: 5` GTTGTCTTTGGTGCCGTGGCCGTGGGGCAAG 3`rev: 5` CTTGCCCCACGGCCACGGCACCAAAGACAAC 3`***P-gp S400N (G1199A)***for: 5` CAGAAATGTTCACTTCAATTACCCATCTCGAAAAG 3`rev: 5` CTTTTCGAGATGGGTAATTGAAGTGAACATTTCTG 3`**Sequenzierprimer zur Überprüfung des Mutagenese-Erfolgs*****BCRP F431L***: AAAGTTGCTGGGTAATCC***BCRP F489L***: AAAGTTGCTGGGTAATCC***BCRP Q141K***: CTGGAGATTTTCGAGCTC***BCRP R482G***: AAAGTTGCTGGGTAATCC***BCRP S248P***: TTACGTGGTACAAGATG***BCRP V12M***: CGTATGTCGAGTTTATCCC***P-gp A893S***: AGCAGGAGTTGTTGAAATG***P-gp A999T***: AGCAGGAGTTGTTGAAATG***P-gp G412G***: AATTGGGGCTTTTAGTG***P-gp I1145I***: GGCAAAGAAATAAGCGAC***P-gp M986V***: AGCAGGAGTTGTTGAAATG***P-gp S400N***: AATTGGGGCTTTTAGTG

**3.1.9 TaqMan Gene Expression Assays**

Hs01053790\_m1 ABCG2 ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2  
(homo sapiens) von Life Technologies (Darmstadt)

Hs01003267\_m1 HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) (homo  
sapiens) von Life Technologies (Darmstadt)

**3.1.10 Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Agarosegelkammern SciePlas	Herolab (Wiesloch)
Analysenwaage PT2100	Sartorius (Göttingen)
Brutschrank (E.coli) Kelvitron®t	Heraeus (Hanau)
C6 Flow Cytometer	BD Accuri (Heidelberg)
CO <sub>2</sub> -Inkubator InCusafe	Sanyo (München)
Digitalwaage BP210D	Sartorius (Göttingen)
ECL Dokumentationsanlage ChemiLux	Intas (Göttingen)
Einfrierröhrchen, Cryo	Sarstedt (Nümbrecht)
Einwegpipetten (2, 5 und 10 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Eismachine AF200	Scotsman (Milan, I)
Elektrophorese-Apparatur Mini-PROTEAN	Bio-Rad (München)
Electrophoresis Power Supply EV231	Peqlab (Erlangen)
Filterpapier 3 MM	Bio-Rad (München)
Gefrierschränke (- 20 °C)	Liebherr (Ochsenhausen)
Geldokumentationssystem Gel IX Imager	Intas (Göttingen)
Laser-Scanning-Mikroskop A1	Nikon (Düsseldorf)
Kühlschränke (4 °C)	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühltruhe (- 80 °C) VIP™Series	Sanyo (München)
Kühltruhe (- 180 °C)	Sanyo (München)
Magnetrührer & Heizplatte RCT basic	IKA (Staufen)
Magnetrührer KMO2 basic	IKA (Staufen)
Mikroskop invers, ID03	Zeiss (Jena)
Mikrotiterplatten Lesegerät Sunrise™	Tecan (Crailsheim)
Nanophotometer	Implen (München)
Nitrocellulose Protran (0,45 µm)	Roth (Karlsruhe)
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)

PCR-Platten (96-Well)	Life Technologies (Darmstadt)
pH-Meter 766 Calimatic	Knick (Berlin)
Pipetten P20, P100, P200, P1000	Gilson (Middleton, USA)
Pipette 10	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettierhilfe pipetus® akku	Hirschmann (Eberstadt)
Power Supply PowerPac300	Bio-Rad (München)
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Ochs (Hildesheim)
Reinraumwerkbank LaminAir HB 2472	Heraeus (Hanau)
Reinraumwerkbank Safe 2020	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Reinstwasseranlage Ultra Clear	SG (Barsbüttel)
7500 Fast Real-Time-PCR	Applied Biosystems (Darmstadt)
Scanner ScanMaker i900	Microtek (Willich)
Schüttelinkubator ( <i>E.coli</i> ) Innova 4300	New Brunswick (Edison, USA)
Semi-Dry Elektroblotter Sedec™ M	Peqlab (Erlangen)
Spritzen (20 ml, 60 ml)	B.Braun (Melsungen)
Spritzensterilfilter (0,45 µm, 0,2 µm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Thermocycler advanced Primus 96	Peqlab (Erlangen)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Fresco 21	Thermo-Scientific (Waltham, USA)
Tischzentrifuge 5430	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus	Bandelin (Berlin)
Verschlussfolie, Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Wisconsin, USA)
UV-Visible Spektrophotometer	Varian (Palo Alto, USA)
Vortexer Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Wasserbad Typ 1003	GFL (Burgwedel)
Zellkulturflaschen T25 und T75	Greiner bio-one (Frickenhäusen)
Zellkulturplatten (6-Well)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatten (24-Well)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatten (96-Well)	Zell-kontakt GmbH (Nörten- Hardenberg)
Zellkulturschale 10 mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifuge Heraeus Multifuge IS-R	Thermo-Scientific (Waltham, USA)

Zentrifugen- und Reaktionsgefäße, Falcon  
(10, 15 und 50 ml)

Greiner bio-one (Frickenhausen)

### 3.1.11 Software

CFlowPlus

BD Accuri (Heidelberg)

CitaviPro

Swiss Academic Software GmbH  
(Schweiz)

FinchTV

Geospiza (Seattle, USA)

GraphPad Prism 5

GraphPad Software (San Diego, USA)

Microsoft Office 2007

Microsoft Deutschland GmbH  
(Unterschleißheim)

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter E.coli-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter E.coli-Zellen wurden One Shot<sup>®</sup> Top10 kompetente E.coli-Zellen der Firma Invitrogen über Nacht bei 37 °C und 180 rpm mit 50 ml LB-Medium im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml dieser Übernachtskultur angeimpft und wieder bei 37 °C geschüttelt. Nach ca. 2 h erfolgte die Messung der optischen Dichte gegen LB-Medium bei 600 nm. Bei einer optischen Dichte von maximal 0,6 (eine höhere optische Dichte führt zu geringerer Kompetenz der Zellen) wurde der Ansatz sofort für 15 min auf Eis gestellt. Nach Aufteilung der Bakteriensuspension auf 50 ml Röhrchen wurde bei 4,500 × g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden vorsichtig in 12,5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine weitere 10-minütige Zentrifugation bei 4,500 × g und 4 °C. Nach Absaugung des Überstandes wurden die Pellets in 5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Glycerin-Lösung suspendiert, in 250 µl-Portionen aliquotiert und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Diese 250 µl-Portionen wurden bei - 80 °C gelagert.

### **3.2.2 Transformation kompetenter E.coli-Zellen**

Die Transformation kompetenter E.coli-Zellen erfolgte nach der Methode von Mandel und Higa (Mandel und Higa, 1970). 100 µl der kompetenten Zellen wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 45 s ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt und danach für 2 min auf Eis abgekühlt. Während dieser Zeit findet die DNA-Aufnahme in die Zellen statt. Nach Zugabe von 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium wurde für 60 min bei 37 °C und 300 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Der Ansatz wurde dann unter sterilen Bedingungen auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert.

### **3.2.3 Plasmidpräparationen aus E.coli-Kulturen im kleinen Maßstab (Minipräp)**

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly angewendet (Birnboim und Doly, 1979). Nach einer Animpfung von 5 ml sterilem antibiotikahaltigen LB-Medium mit einer einzelnen E.coli-Kolonie wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml der E.coli-Übernachtskultur in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 21,000 × g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Minipräp-Lösung I resuspendiert und das Gemisch für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Bakterienzellen zu lysieren, wurden 150 µl Minipräp-Lösung II zugegeben und das Gemisch erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden 200 µl Minipräp-Lösung III hinzugefügt, kurz gevortext und noch einmal für 10 min inkubiert. Durch 20-minütige Zentrifugation bei 21,000 × g wurden die denaturierten Proteine vom Überstand getrennt. Der Überstand (ca. 450 µl) wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 450 µl Isopropanol und 45 µl 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,8 extrahiert und für 60 min bei 21,000 × g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol (V/V) versetzt, getrocknet und in 20 µl destilliertem Wasser aufgenommen. Zur Inaktivierung eventuell vorhandener DNasen wurde die Lösung für 10 min bei 65 °C im Schüttler erhitzt und danach bei - 20 °C gelagert.



### **3.2.4 Plasmidpräparationen aus E.coli-Kulturen im großen Maßstab (Maxipräp)**

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 200 ml LB-Medium mit 200 µl Antibiotika versetzt, mit der Minipräparationskultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator (180 rpm) inkubiert. Die DNA wurde mittels des PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kits von Invitrogen nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### **3.2.5 Analyse der Plasmid-DNA**

Zur Analyse der Plasmid-DNA wurde 1 µg der Plasmid-DNA mit Typ II-Restriktionsendonukleasen geschnitten, so dass bei der Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden konnte, ob die Klonierung der Plasmid-DNA erfolgreich war. Dies geschah anhand der Größe der entstandenen Fragmente.

### **3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung der DNA nach ihrer Größe im elektrischen Feld erfolgte nach einer von Aaij und Borst beschriebenen Methode (Aaij und Borst, 1972). Es wurde ein 1 %iges Agarosegel (*m/V*) verwendet, das durch Aufkochen von Agarose in TAE-Puffer 1x hergestellt wurde und mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurde. Die Gelmatrix wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm für die Auftragung der Proben auf einer Seite des Gels hineingesteckt. Aus dem erstarrten Agarosegel wurde der Kamm entfernt und die Gelkammer in eine Horizontalelektrophoresekammer gelegt, die mit TAE-Puffer gefüllt war. Die DNA wurde mit 6 × DNA-Probenpuffer versehen und in die Taschen des Agarosegels aufgetragen. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V. Anhand des aufgetragenen DNA-Größenstandards wurde im Geldokumentationssystem IX Imager<sup>TM</sup> mit Hilfe von UV-Licht die Größe der DNA-Fragmente bestimmt.

### **3.2.7 Klonierung von Plasmid-DNA in Plasmidvektoren**

Zur Restriktion der Plasmid-DNA wurden beim präparativen Restriktionsverdau 5-15 µg DNA mit Typ-II-Restriktionsendonukleasen in einem Gesamtvolumen von 50 µl geschnitten. Die Reaktionsbedingungen der Restriktionsendonukleasen wie

Puffer, Reaktionstemperatur und Zusatz von BSA wurden im Katalog der Firma New England Biolabs beim jeweiligen Datenblatt des Enzyms nachgeschlagen.

Um die Religation des Vektors nach der Restriktion zu vermeiden, wurden die durch die Restriktionsendonukleasen geschnittenen Enden des Vektors dephosphoryliert. Dies geschah nach dem Restriktionsverdau durch Zugabe von alkalischer Phosphatase. Die Dephosphorylierung wurde mit 50 µl DNA, 6 µl Shrimp Alkaline Phosphatase Puffer, 3 µl Shrimp Alkaline Phosphatase und 1 µl destilliertem Wasser durchgeführt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C und anschließend für 20 min bei 65 °C inkubiert.

Zur Isolierung des geschnittenen und dephosphorylierten Vektors und des DNA-Inserts wurden diese mittels Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und die DNA-Banden mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Eluierung der DNA aus dem Agarosegel wurde die Freeze-und-Squeeze-Methode von Thuring et al. angewendet (Thuring et al., 1975).

Die Ligation wurde in fünf Reaktionsansätzen durchgeführt, bei denen die Vektor-DNA-Menge jeweils gleichblieb und die Insert-DNA-Menge gesteigert wurde. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit Vektor-DNA ohne Insert-DNA. Der Ligationsansatz wurde verwendet, um das Konstrukt in kompetente E.coli-Zellen zu transformieren.

#### ***a) Klonierung von BCRP in den Vektor pTRE-Tight-BI-AcGFP1***

Die codierende BCRP-Sequenz (ID# NM\_004827, OriGene) wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI aus dem Vektor pCMV6-XL5 herausgeschnitten und in den Vektor pTRE-Tight-BI-AcGFP1, der ebenfalls mit NotI geschnitten wurde, ligiert. Der Erfolg der Klonierung wurde nachfolgend über analytischen Restriktionsverdau sowie Sequenzierung verifiziert.

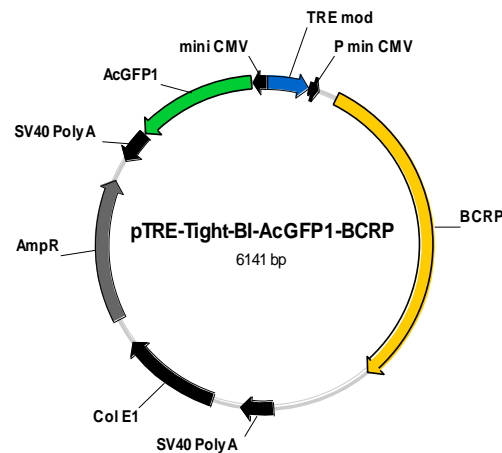


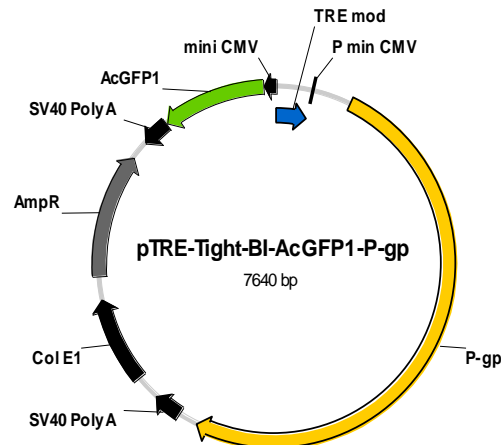
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vektors pTRE-Tight-BI-AcGFP1-BCRP

**b) Klonierung von P-gp in den Vektor pTRE-Tight-BI-AcGFP1 und anschließender Austausch von AcGFP1 gegen tdTomato**

Zuerst wurde der Linker 1 in den Vektor pTRE-Tight-BI-AcGFP1 eingefügt.

1. Linkerdesign: GGCCGCGATCGCCGCGGACGCGTATGGGCCCTA  
CGCTAGCGGCGCCTGCGCATACCCGGGATTCTGA

Dazu wurde der Vektor pTRE-Tight-BI-AcGFP1 mit den Restriktionsendonukleasen NotI und HindIII über Nacht bei 37 °C geschnitten. Nach der Dephosphorylierung wurden die in Wasser gelösten Linker dazupipettiert. Anschließend wurde im Thermocycler bei 95 °C ein fünfminütiges Annealing durchgeführt. Danach erfolgte eine Abkühlung auf 25 °C in einer Stunde. Nachdem der Linker in den Vektor eingebaut war, wurde die codierende P-gp-Sequenz (Addgene Plasmid 10957) mit den Restriktionsendonukleasen SacII und XhoI aus pHaMDRwt (addgene) herausgeschnitten und in den Vektor pTRE-Tight-BI-AcGFP1+Linker, der mit SacII und Sall geschnitten worden war, ligiert. Der Erfolg der Klonierung wurde nachfolgend über analytischen Restriktionsverdau sowie Sequenzierung verifiziert.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des Vektors pTRE-Tight-BI-AcGFP1-pgp**

Nach der Ligation wurde eine Maxipräp der DNA in den negativen E.coli-Zellen durchgeführt, da XbaI sensitiv zur Methylierung ist und XbaI verwendet wird, um den Linker 2 einzufügen.

2. Linkerdesign: CTAGACGCGTTGTACAGCGATCGCGGCGCGCCAGATCTGG  
TGCGCAACATGTCGCTAGCGCCGCGCGGTCTAGACCGC

Für den Linkereinbau wurde ein Restriktionsverdau mit NarI und XbaI über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Nach der Dephosphorylierung wurden wieder die in Wasser gelösten Linker dazupipettiert, im Thermocycler bei 95 °C für 5 min hybridisiert und danach in einer Stunde auf 25 °C abgekühlt. Nach erfolgreicher Ligation des Linkers in den Vektor, wurde dieser mit den Restriktionsendonukleasen Ascl und BsrGI geschnitten. Außerdem wurde der Vektor Lego T2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Kristoffer Weber, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) mit Ascl und BsrGI geschnitten, um tdTomato zu isolieren. tdTomato wurde dann in den Vektor pTRE-Tight-BI-tdTomato-P-gp+2x Linker ligiert.

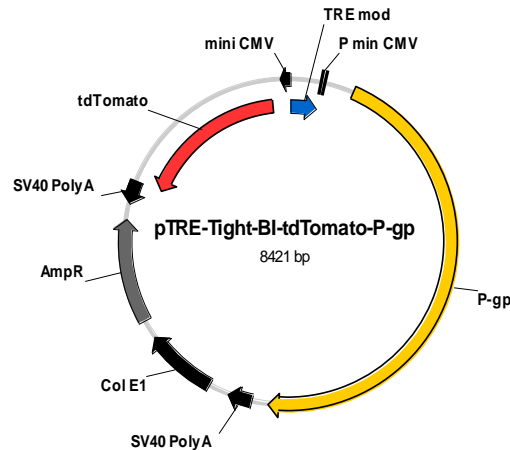


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Vektors pTRE-Tight-BI-tdTomato-pgp

### c) Remutierung von P-gp aus pHaMDRwt von addgene

Im P-gp aus dem Vektor pHaMDRwt von addgene waren zwei Mutationen (T1236C und G1199A) im Vergleich zum P-gp-Wildtyp enthalten. Diese wurden als erstes mit Hilfe des Mutagenese-Reagenziensystems (QuikChange<sup>®</sup> Lightning *Site-Directed-Mutagenesis*) rückmutiert. Der Erfolg der Rückmutation wurde durch Sequenzierung bei der Firma GATC (Konstanz) bestätigt.

### 3.2.8 Gezielte Mutagenese bestimmter Nukleotide

Für die gezielte Mutagenese wurde das Mutagenese Reagenziensystem „QuikChange<sup>®</sup> Lightning *Site-Directed-Mutagenesis*“ von Agilent Technologies verwendet. Der zur Mutagenese benötigte Oligonukleotid-Primer wurde mit Hilfe des Programmes Primer X Primer Design entworfen und durch die Firma MWG-Biotech synthetisiert. Bei der gezielten Mutagenese wird die Plasmid-DNA nach der Denaturierung mit einem Oligonukleotid-Primer, der die gewünschte Mutation enthält, in einem Thermocycler hybridisiert, amplifiziert und ligiert. Nach der PCR liegt neben der gewünschten mutierten DNA (nicht-methyliert) auch noch die anfangs eingesetzte DNA (methyliert) vor. Durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym DpnI, welches ausschließlich methylierte DNA spaltet, wird die anfangs eingesetzte DNA abgebaut, so dass nur noch mutierte DNA vorhanden ist. Die Durchführung der Mutagenese erfolgte nach Herstellerangaben. Die mutierte einzelsträngige DNA wurde in XL10-Gold Zellen transformiert, wo sie zur doppelsträngigen DNA vervollständigt wurde. Der korrekte Einbau der zielgerichteten

Mutation wurde nach der Plasmidpräparation der DNA durch eine DNA-Sequenzanalyse mit geeigneten Oligonukleotiden bei der Firma GATC überprüft.

### 3.2.9 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den Zellen erfolgte mit der Phenol-Chloroform-Extraktion von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die Zellen wurden durch Trizol<sup>®</sup>-Reagenz lysiert und durch anschließende Zugabe von Chloroform extrahiert. Die RNA befand sich dabei in der oberen (wässrigen) Phase. Mit Isopropanol wurde die RNA dann gefällt, und als letzter Schritt wurde die RNA gewaschen und solubilisiert. Die Gewinnung der RNA begann mit dem Absaugen des Mediums und dem einmaligen Waschen mit 1 ml PBS. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 500 µl Guanidinthiocyanat. Um die RNA von Proteinen zu trennen, wurden zum Zellhomogenat 100 µl Chloroform zugegeben. Das Ganze wurde 15 s gevortext und 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Phasentrennung wurde durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12,000 × g erzielt. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in vorbereitete Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Die RNA aus dem wässrigen Überstand wurde mit 250 µl Isopropanol versetzt, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation mit 12,000 × g bei 4 °C wurde der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgesaugt und das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol (V/V) gewaschen. Das RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl DEPC-Wasser gelöst.

### 3.2.10 Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch im UV durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Reinheit der isolierten RNA wurde durch den Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm zu der bei 280 nm bestimmt. Dieser sollte bei reiner RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 3.2.11 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem *RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis* Reagenziensystem von Fermentas. Das Reagenziensystem verwendet die *RevertAid<sup>TM</sup> H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase*, die eine Punktmutation

enthält, die die RNase H Aktivität komplett eliminiert. Dadurch findet der RNA-Abbau nicht während der Erststrang cDNA-Synthese statt. Bei der cDNA-Synthese wurde ein Mastermix mit Random Hexamer Primer, 5x Reaction Buffer, RiboLock RNase Inhibitor, dNTP Mix und RevertAid<sup>TM</sup> H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase hergestellt. Davon wurden 9 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, 500 ng RNA zugegeben und mit Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Das Ganze wurde gemischt, zentrifugiert und in den Thermocycler gestellt. Im Thermocycler wurden die Primer bei 25 °C für 5 min verlängert. Anschließend wurde die Temperatur für 60 min auf 42 °C erhöht, wobei die cDNA synthetisiert wurde. Um die Reaktion zu beenden und die M-MuLV reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurde am Ende 5 min bei 70 °C inkubiert.

### **3.2.12 Quantitative Real-Time-PCR mit Taq-Man-Sonden**

Die Real-Time-PCR wurde für Genexpressionsuntersuchungen genutzt. Die Amplifikation der DNA-Moleküle wurde während der exponentiellen Phase detektiert. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (kurz FRET) benutzt. Dazu wurden TaqMan-Sonden verwendet, deren 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff und deren 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert sind. Durch die räumliche Nähe des Reporter-Farbstoffs zum Quencher wird die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt. Wenn die TaqMan-Sonden in der Elongation von den Taq-Polymerasen abgebaut werden, wird die Verbindung zwischen Reporter und Quencher aufgehoben und somit wird die Fluoreszenz des Farbstoffs messbar. Diese Fluoreszenz ist dabei proportional zur Zahl der gebildeten DNA-Stränge (Holzapfel und Wickert, 2007). Die quantitative RT-PCR erfolgte am 7500 Fast Real-Time-PCR-System. Die cDNA wurde 1:8 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Pro Probe wurden je 1 µl TaqMan Assay, 10 µl Fast Universal Mastermix 2x und 9 µl der 1:8 verdünnten cDNA (28,13 ng cDNA) verwendet. Das Ganze wurde in eine Optical 96-Well-Platte pipettiert, die mit einer Folie versiegelt wurde. Die Platte wurde kurz zentrifugiert und in das RT-PCR-Gerät eingelegt.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

50 °C für 2 min

95 °C für 10 min

danach 40 Zyklen:

95 °C für 15 sec

60 °C für 1 min

Die Quantifizierung erfolgte relativ, indem die Genexpression des zu untersuchenden Gens auf das konstitutiv exprimierte Gen (Referenzgen) HPRT1 bezogen wurde. Die Berechnung des Genexpressionsunterschiedes erfolgte über die delta delta Ct-Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Zuerst wurde für jede Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (Normalisierung zum konstitutiv exprimierten Gen). Anschließend erfolgte eine Normalisierung zur Kontrolle, indem vom Ct-Wert der behandelten Probe der Ct-Wert der Kontrolle abgezogen wurde. Zur Ermittlung des Genexpressionsunterschiedes wurde der delta delta Ct-Wert in den Ausdruck  $2^{-\text{delta delta Ct}}$  eingesetzt.

### **3.3 Zellbiologische Methoden**

#### **3.3.1 Zellkulturarbeiten**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Das Medium wurde vor der Arbeit unter der Werkbank für ca. 30 min bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen bei 37 °C in 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

#### **3.3.2 Kultivierung der Zellen**

Monolayer der Zellen wurden im Zellkulturmedium DMEM mit 4,5 g/l Glucose unter Zusatz von 10 %igem fetalen Kälberserum und 1 %igem Pen/Strep angezüchtet. Bei einer Konfluenz der Zellen von 80-90 % wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS-Lösung gespült. Die Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflaschen erfolgte durch Zugabe von 2-3 ml Trypsin/EDTA (1x). Zellkulturflaschen wurden leicht geschwenkt und ca. 1 min (bei MDCKII-par-Zellen und MDCKII-BCRP-Zellen ca. 10-15 min) im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Einwirkzeit wurde gering gehalten, da Trypsin/EDTA (1x) auch lebenswichtige Proteine der Zellen verdaut. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde Trypsin/EDTA (1x) durch Zugabe von FBS-haltigem Medium gestoppt. Die



Zellsuspension wurde im Falcon-Reaktionsgefäß mit der Pipette gut durchmischt und in neue Zellkulturflaschen je nach gewünschter Anzahl an Zellen gegeben.

### 3.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung wurde in der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dazu wurde ein Deckglas auf die Neubauer-Zählkammer geschoben. Unter dieses Deckglas wurde die Zellsuspension pipettiert. Diese saugte sich durch die Kapillarkraft in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Neubauer-Zählkammer. Mit einem Lichtmikroskop wurden anschließend die Zellen der vier großen Eckquadrate gezählt und der Mittelwert errechnet. Dieser Wert wurde zur Umrechnung auf die Anzahl der Zellen pro  $\mu\text{l}$  mit 10 multipliziert.

### 3.3.4 Transfektion der Zellen

Die transiente Transfektion wurde mit Hilfe des Reagenzes jetPRIME<sup>TM</sup>, einem nicht-liposomalen Transfektionsreagenz, durchgeführt. Es wurden 400.000 Zellen pro Well der 6-Well-Platte ausplattiert und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden 2  $\mu\text{g}$  DNA mit 200  $\mu\text{l}$  jetPRIME<sup>TM</sup>-Puffer vermischt und zentrifugiert. Nach Zugabe von 4  $\mu\text{l}$  des jetPRIME-Reagenzes wurde das Gemisch gevortext, wieder zentrifugiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  des Ansatzes vorsichtig auf die Zellen gegeben.

### 3.3.5 Ernten der Zellen

Die Zellen wurden standardmäßig mit Trypsin/EDTA (1 $\times$ ) von der Oberfläche der Zellkulturflaschen abgelöst und dann 5 min bei 800  $\times g$  zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen, wiederum 5 min bei 800  $\times g$  zentrifugiert und bei -80 °C aufbewahrt. Es wurde später zur RNA-Aufarbeitung verwendet.

### 3.3.6 Kryokonservierung der Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellen wurden diese bis zur Konfluenz in T75-Zellkulturflaschen kultiviert, mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (1 $\times$ ) abgelöst. Nach der Zentrifugation (5 min bei 900 rpm) wurde die Zellzahl auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro

Kryoröhrchen eingestellt und wiederum zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in Einfriermedium (DMEM mit 4,5 g/l Glucose + 20 % FCS) resuspendiert. Anschließend wurde eine DMSO-Lösung (DMEM mit 4,5 g/l Glucose + 20 % FCS + 10 % DMSO) langsam dazupipettiert. Nach vorsichtigem Schwenken wurde die Zellsuspension auf die Kryoröhrchen verteilt und in das Kryo-Einfriergerät „Mr. Frosty“ gestellt, welches mit Isopropanol gefüllt war. Mit Hilfe dieses Kryo-Einfriergeräts wurden die Zellen in der - 80 °C Kühltruhe langsam abgekühlt (1 °C/min). Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen am nächsten Tag in die - 180 °C Kühltruhe gegeben.

### **3.3.7 Auftauen der Zellen**

Beim Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen schnell im 37 °C Wasserbad aufgetaut, vorsichtig mit 20 ml Zellkulturmedium vermischt und in eine T75-Zellkulturflasche gegeben. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das DMSO zu entfernen.

### **3.3.8 Versuche mit transient transfizierten HEK293-Tet-On- und HEK293-Tet-Off-Zellen**

Für das Tet-On-System wurden die HEK293-Tet-On<sup>®</sup>-Advanced Zellen der Firma Clontech (stabile Expression von rtTA) 24 h nach der transienten Transfektion mit verschiedenen Doxyzyklin-Konzentrationen (0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml) inkubiert und nach weiteren 24 h oder 48 h der jeweilige Versuch gestartet.

Für das Tet-Off-System wurde die generierte stabile HEK293-Tet-Off-Zelllinie (stabile Expression von tTA) nach der transienten Transfektion mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen (0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml) behandelt und ca. 68 h nach der Doxyzyklin-Zugabe untersucht.

### **3.3.9 Herstellung einer stabilen HEK293-Tet-Off-Zelllinie bzw. einer stabilen HEK293-Tet-On-BCRP-Zelllinie**

Zur Herstellung einer stabilen HEK293-Tet-Off-Zelllinie bzw. einer stabilen HEK293-Tet-On-BCRP-Zelllinie wurden HEK293-Zellen in einer Schale mit einem

Durchmesser von 10 cm ausplattiert. Nach 12 h wurden die Zellen mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert. Nach weiteren 12 h wurden die Zellen 1:20 bzw. 1:16 in acht 10 cm Schalen gesplittet. 24 h später wurden G418-Sulfat (für HEK293-Tet-Off-Zellen) oder G418-Sulfat und Hygromycin (für HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen) zugegeben. Nach jedem vierten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach ca. 20 Tagen wurden die erschienenen Einzelkolonien gepickt und auf eine 6-Well-Platte gebracht. Diese isolierten Klone wurden weiter expandiert und anschließend überprüft.

### **3.3.10 MTT-Test**

Der MTT-Test dient zur Untersuchung der Zellviabilität und wurde nach der Methode von Lindl durchgeführt (Lindl, 2002). Beim MTT-Test wird das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid durch die mitochondrialen Dehydrogenasen NADH und NADPH in ein blau-violettes Formazan reduziert. Dieses kann mit den Detergentien Natriumdodecylsulfat und Dimethylsulfoxid aus den Zellen herausgelöst werden. Die Intensität der Formazanlösung, die mit der Zellviabilität der Zelle korreliert, kann photometrisch bestimmt werden (Mess-Wellenlänge 550 nm, Referenz-Wellenlänge 630 nm). Der MTT-Test wurde in 96-Well-Platten durchgeführt.  $10^4$  Zellen wurden pro Well ausgesät und für 24 h bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Testsubstanzen in den jeweiligen Konzentrationen zugegeben. Nach einer 1-stündigen bzw. 24-stündigen Inkubation wurde 20 µl der MTT-Lösung (5 mg/ml) in jedes Well gegeben und die 96-Well-Platte für 5 min auf einem Schüttler geschüttelt. Danach wurde die Platte für 2 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und in jedes Well 100 µl der Lysislösung pipettiert, um das Formazan herauszulösen. Die 96-Well-Platte wurde 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann 5 min auf einem Schüttler geschüttelt und daraufhin photometrisch vermessen.

### **3.4 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.4.1 Proteinisolierung aus Zellen**

In 6-Well-Platten behandelte Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 150 µl des 1x Cell-Lysis-Puffers von Cell-Signaling Technology versetzt, zu dem vorher 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid gegeben wurde. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden kurz geschallt und danach das Zelllysate für die SDS-Page verwendet. Für die Gewinnung der Membranfraktion wurde der Überstand nach der 10-minütigen Zentrifugation 30 min bei  $50.000 \times g$  zentrifugiert. Das Zellpellet stellte die Membranfraktion dar.

#### **3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Durch Komplexbildung des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann photometrisch gemessen werden. Die Stärke der Farbreaktion ist vom Protein abhängig. Der Proteingehalt wurde über eine Kalibriergerade mit BSA-Lösungen von 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml und 400 µg/ml bestimmt. Die Proben wurden 1:50 mit PBS verdünnt. In eine 96-Well-Platte wurden jeweils 10 µl Standard bzw. Probe pipettiert, dazu wurden 190 µl Bradford-Reagenz (Roti Quant®) gegeben. Die Absorption der Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt.

#### **3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) (Laemmli, 1970)**

Die Gelelektrophorese wurde nach der Methode der diskontinuierlichen SDS-Page nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Bei der SDS-PAGE werden die Proteine durch Zugabe von einem Überschuss Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Außerdem wird SDS in einer konstanten Menge (1,4 g SDS pro g Protein) von den Proteinen gebunden, so dass die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Die Proteine sind dann alle gleichmäßig negativ geladen und die Auftrennung der Proteine geschieht dadurch nur nach der Molekülmasse. Die

denaturierten Proteine werden in einem Polyacrylamid-Gel in einem elektrischen Feld getrennt. Zuerst werden die Proteine in einem kurzen weitporigen Sammelgel (pH 6,8) konzentriert und danach in einem längeren engporigen Trenngel (pH 8,8) nach der Molekülmasse aufgetrennt.

Zur Probenvorbereitung wurden 25 µg Protein mit der gleichen Menge 2 × SDS-Probenpuffer versetzt, 3 min bei 99 °C gekocht und anschließend mit 2 µl Bromphenolblau-Puffer versetzt, um die Proben sichtbar zu machen.

Für die SDS-Page wurde zuerst ein 10 %iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wurde Isopropanol abgesaugt und das 6 %ige Sammelgel angesetzt. Die Sammelgel-Lösung wurde über das Trenngel gegossen. Es wurde ein Kamm eingesetzt, um Taschen zum Einfüllen der Proben zu erhalten. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, wurde das Polyacrylamid-Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proben wurden in die Taschen pipettiert, eine Tasche wurde mit einem Proteinstandard befüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 90 V für 2-3 h durchgeführt.

#### **3.4.4 Western-Blot-Analyse (Immunoblot-Analyse)**

Bei der Western-Blot-Analyse werden die durch eine Elektrophorese aufgetrennten Proteine aus einem Trenngel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und danach mittels verschiedener Antikörper detektiert. Die durch SDS-Page getrennten Proteine wurden mit Hilfe des Semidry-Blot-Systems von Bio-Rad Laboratories auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Towbin et al., 1979). Dazu wurden zuerst Filterpapiere, die mit Transferpuffer getränkt waren, in die Blottingkammer gelegt. Darauf kamen die ebenfalls mit Transferpuffer getränkte Nitrocellulosemembran, das Gel und die noch einmal in Transferpuffer eingeweichten Filterpapiere. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von ca. 3 mA pro Quadratcentimeter SDS-Gel/Nitrocellulosemembran. Die Kontrolle des Proteintransfers erfolgte durch Anfärbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S. Dazu wurde die Membran für 2 min in Ponceau S Färbelösung inkubiert, anschließend für 2 min mit Reinstwasser gespült und dann eingescannt, um die Erkennbarkeit der Proteinbanden zu überprüfen.

Bei BCRP wurde zur Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran und zur Auswaschung von Ponceau S die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4 °C in 5 %iger Milchpulverlösung ( $m/V$ ) in 1 × TBST gelagert. Am nächsten Tag wurde die Membran nach dreimaligem Waschen mit 1 × TBST für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler mit dem Primärantikörper für BCRP (BXP-21; 1:1000) behandelt. Wieder wurde dreimal mit 1 × TBST gewaschen, anschließend erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Mouse (H+L) HRP; 1:2000), der an die Meerrettichperoxidase (engl. *Horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist. Die HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, wobei Chemilumineszenz detektiert werden kann. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 1 × TBST erfolgte die Detektion der Proteine durch enzymatische Umsetzung eines HRP-Substrats (Lumi-Light<sup>Plus</sup> Western-Blot Substrat Reagenzien-system) in einer ECL-Dokumentationsanlage mit dem Programm Chemilux.

Bei P-gp wurde zur Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran und zur Auswaschung von Ponceau S die Nitrocellulosemembran nur für 20 min in 5 %iger Milchpulverlösung ( $m/V$ ) in 1 × TBST gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 × TBST erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für P-gp (Mouse Anti-P-Glykoprotein Antikörper; 1:100) über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelschüttler. Wieder wurde dreimal mit 1 × TBST gewaschen, anschließend wurde für 10 min in 5 %iger Milchpulverlösung ( $m/V$ ) in 1 × TBST inkubiert, wiederum dreimal mit 1 × TBST gewaschen und dann 50 min mit dem Sekundärantikörper (Anti-Mouse (H+L) HRP; 1:2000), der an die Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, behandelt. Die Detektion erfolgte analog zu BCRP.

### 3.5 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Immunfluoreszenz-Analysen werden genutzt, um Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen und ihre Lokalisation in der Zelle zu charakterisieren. Bei der hier verwendeten indirekten Immunfluoreszenz bindet zunächst ein spezifischer Primärantikörper an die zellulären Proteine und anschließend ein Sekundärantikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist, an den Primärantikörper. Die Untersuchung der Proteine erfolgt an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop A1.

Zur Fixierung der Zellen wurden behandelte Zellen in einer 96-Well-Platte zweimal mit TBS-Puffer gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur in 4 %iger Paraformaldehydlösung (Roti<sup>®</sup>Histofix) inkubiert. Die fixierten Präparate wurden nach jeweils fünfminütigem dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer bei Raumtemperatur für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet oder bei 4 °C lichtgeschützt bis zu einer Woche gelagert.

Bei der Immunfluoreszenz-Analyse wurden die fixierten Zellen für 30 min mit Blocking-Lösung versetzt. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit TBS-Puffer für 5 min gewaschen und danach mit dem Primärantikörper für BCRP (BXP-21) in einer Verdünnung von 1:2000 in der Dako-Antikörper-Lösung (*Dako antibody diluent*) für 16 h bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer für je 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Anti-Mouse IgG (whole molecule) R-Phycoerythrin) in einer Verdünnung von 1:80 in der Dako-Antikörper-Lösung (*Dako antibody diluent*). Die Zellkerne wurden mittels Hoechst 33342 für 60 min angefärbt, erneut mit TBS-Puffer gewaschen und an einem Nikon A1 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 %igem CO<sub>2</sub> bei 60-facher Vergrößerung in einer Ölimmersion untersucht. Das Phycoerythrin wurde nach Anregung bei 514,5 nm mit einem Bandpassfilter bei 570-620 nm aufgenommen. Hoechst 33342 wurde bei 403,9 nm angeregt, und die Aufnahme erfolgte mit einem Bandpassfilter bei 425-475 nm.

### 3.6 Durchflussszytometrie

In der Durchflussszytometrie wird die Fluoreszenzintensität verschiedener Fluorophor-beladener Zelltypen nach Anregung mit monochromatischem Licht untersucht. Die analysierte Zellsuspension wird in einen Hüllstrom eingebracht, der eine höhere Strömungsgeschwindigkeit hat (Luttmann et al., 2004, Sack et al., 2007). Dadurch werden die Zellen vereinzelt und passieren im Hüllstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander einen Laserstrahl. Dabei wird die Lichtstreuung als Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) gemessen, außerdem erfolgt eine Messung der Fluoreszenzintensität in prädefinierten Detektionsbereichen. Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Zellgröße und wird in einem geringen Winkel von 3-10 ° gemessen. Das Seitwärtsstreulicht wird in einem Winkel von 90 ° gemessen und ist proportional zur Zellgranularität. Die Fluoreszenzsignale, die in alle Richtungen

ausgesendet werden, werden im Winkel von 90 ° detektiert. Bei dem verwendeten Durchflusszytometer (C6 Flow Cytometer, BD Accuri (Heidelberg)) wird die Fluoreszenzemission über vier Kanäle erfasst. Für den ersten Laser (blauer Laser, 488 nm) stehen drei Kanäle zur Verfügung:

FL-1: 530±15 nm

FL-2: 585±20 nm

FL-3: > 670 nm

Der Fluoreszenzkanal 4 (FL-4) steht für den roten Laser (640 nm) mit 675±12,5 nm bereit. Durch ein System von Spiegeln werden die Signale zu ihren Detektoren, den Photodioden (FSC) und Photomultipliern (FSC und Fluoreszenz) geführt. Hier werden die Photonen aufgefangen und in ein elektrisches Signal verwandelt. Die digitalisierten Daten werden dann mit einem Computer weiterverarbeitet.

### 3.6.1 PhA-Efflux-Assay

Der PhA-Efflux-Assay bietet eine Möglichkeit, die Funktionalität von ABC-Transportern bzw. die Hemmung der ABC-Transporter-Funktion durch Arzneistoffe zu messen. In Efflux-Assays wird die zelluläre Akkumulation fluoreszierender ABC-Transporter-Substrate detektiert und so kann indirekt auf die ABC-Transporter-Funktion rückgeschlossen werden (Sarkadi et al., 2006). Der PhA-Efflux-Assay wurde durchgeführt wie bereits von uns beschrieben (Weiss et al., 2010). Die für den Assay vorbereiteten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (1×) von der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend erfolgte eine Zellzählung. In jedes Reaktionsgefäß wurden  $10^6$  Zellen gegeben. Nach einer Zentrifugation (5 min, 1500 rpm) wurden die Zellpellets mit 500 µl RPMI + 2 % FCS + 1 µM PhA resuspendiert und für 30 min bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert (Beladung mit PhA). Danach wurden die Reaktionsgefäße mit der Tischzentrifuge zentrifugiert (1,500 xg, 5 min, 4 °C) und auf Eis gestellt. Die Überstände wurden vorsichtig abgesaugt, es wurde einmal mit 1 ml eiskaltem RPMI mit 2 % FCS gewaschen. Die zu testenden Substanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in 500 µl + 2 % FCS zugegeben. Die Zellen wurden resuspendiert und 60 min bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert (Effluxphase). Nach einer Zentrifugation mit der Tischzentrifuge (1,500 xg, 5 min, 4 °C) wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt. Die Überstände wurden vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet wurde einmal mit eiskaltem PBS mit



2 % FCS gewaschen. In jedes Reaktionsgefäß wurden 500 µl PBS mit 2 % FCS gegeben, um die Zellen zu resuspendieren. Abschließend wurde die Intensität von PhA in den Zellen mit dem Durchflusszytometer im FL-4 Kanal vermessen.

Zur Auswertung des PhA-Efflux-Assays wurden in jeder Probe 30.000 Zellen gezählt. Zellschrott wurde eliminiert, indem die lebenden Zellen in der Streulicht-Dot-Plot-Darstellung (Vorwärtsstreulicht vs. Seitwärtsstreulicht) *gated* wurden, d. h. es wurde ein elektronisches Fenster um die lebenden Zellen gesetzt und dieses diente zur Auswahl dieser Zellen in einer neuen Darstellung. Zusätzlich wurden die BCRP-positiven HEK293-Tet-On-Zellen anhand ihres AcGFP1-Signals *gated*. AcGFP1 wurde als Reportergen genutzt und ermöglichte das Gaten auf BCRP-positive Zellen. Der inhibitorische Effekt der Substanzen wurde quantifiziert, indem die Inhibitions-Ratio berechnet wurde. Diese errechnet sich aus dem Quotienten der Median-Fluoreszenz der mit Doxzyklin-induzierten Zelllinie mit und ohne Inhibitor während der Effluxperiode und der Median-Fluoreszenz der nicht-induzierten Zelllinie mit und ohne Inhibitor (Weiss et al., 2010).

### 3.6.2 Calcein-AM-Assay

Auch der Calcein-AM-Assay bietet eine Möglichkeit, die Funktionalität von ABC-Transportern bzw. die Hemmung der ABC-Transporter-Funktion durch Arzneistoffe zu messen. Die für den Assay vorbehandelten Zellen wurden für 30 min mit RPMI + 2 %igem FCS equilibriert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und danach für 10 min bei 37 °C mit den Testsubstanzen auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde Calcein-AM zugegeben und für 60 min bei 37 °C auf dem Schüttler geschüttelt. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm. Die Zellen wurden dann auf Eis gestellt und einmal mit PBS + 2 %igem FCS gewaschen. Die Fluoreszenzintensität des Calceins wurde im Durchflusszytometer im FL-1 Kanal vermessen. Die Auswertung erfolgte analog zum PhA-Efflux-Assay. Allerdings wurden erfolgreich transfizierte Zellen durch ihre tdTomato-Positivität (FL2-Kanal) identifiziert, *gated* und somit der Auswertung der Calcein-Intensität zugeführt.

### 3.6.3 Zellsortierung

Bei der Zellsortierung werden Zellen nach bestimmten Fluoreszenzeigenschaften aufgetrennt. Zur Vorbereitung der Zellsortierung wurden HEK293-Tet-On-Zellen mit unterschiedlichen stabil integrierten BCRP-Konstrukten kultiviert und für 24 h mit Doxzyklin behandelt. Danach wurden die Zellen für 30 min mit PhA beladen. Dazu wurde zu den Zellen 1  $\mu$ M PhA gegeben und 30 min auf dem Schüttler bei 500 rpm geschüttelt. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem RPMI + 2 %igem FCS erfolgte ein einstündiger Efflux mit RPMI + 2 %igem FCS auf dem Schüttler. Die Zellsortierung fand am MoFlo-Zytometer der Firma DAKO-Cytomation am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig statt. Die Zellen, die AcGFP1 positiv waren und eine vergleichbare erniedrigte PhA-Intensität (= Hinweis für BCRP-Aktivität) aufwiesen, wurden in einem Röhrchen mit geeignetem Zellkulturmedium aufgefangen und wieder kultiviert.

### 3.7 Statistische Analyse

Alle Analysen wurden mit der GraphPad Software Version 5 durchgeführt. Die Daten werden als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt. Mit n wurde die Anzahl der Einzelversuche bezeichnet. Der Vergleich der Mittelwerte zweier unverbundener Stichproben erfolgte durch den zweiseitigen studentischen T-Test. Als statistisch relevantes Signifikanzniveau wurde ein P-Wert von 0,05 angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Etablierung der Tet-Systeme

#### 4.1.1 Ermittlung der optimalen Antibiotikakonzentration und Zelldichte

Zur Selektion der positiven Klone bei der Herstellung stabiler HEK293-Tet-Off-Zellen bzw. stabiler HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen oder -BCRP-Mutanten-Zellen wurde die optimale Konzentration der Selektionsmarker ermittelt, da diese Konzentration je nach Zelltyp und Wachstumszyklus variieren kann. Als Selektionsmarker wurden für stabile HEK293-Tet-Off-Zellen G418-Sulfat und für stabile HEK293-Tet-On-BCRP-Wildtyp-Zellen oder -BCRP-Mutanten-Zellen G418-Sulfat kombiniert mit Hygromycin verwendet. Nach einer Behandlung von HEK293-Zellen mit jeweils 0, 100, 200 und 400 µg/ml G418-Sulfat bzw. mit jeweils 0, 10, 25, und 50 µg/ml Hygromycin wurde 10-14 Tage inkubiert und die Anzahl lebender Zellen mikroskopisch beurteilt. Die geringste Konzentration, bei der ein massiver Zelltod innerhalb von fünf Tagen stattfand und bei der alle Zellen innerhalb von zwei Wochen starben, wurde als Optimum für den Selektionsmarker definiert. Bei den HEK293-Zellen lag diese Konzentration von G418-Sulfat bei 200 µg/ml und von Hygromycin bei 50 µg/ml.

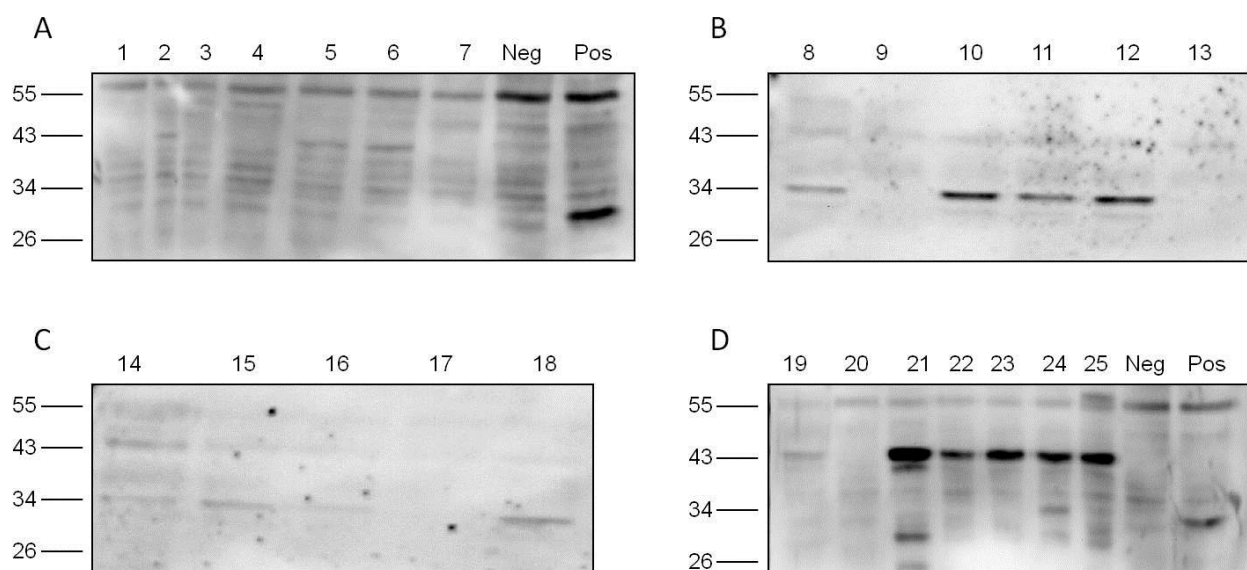
Für die Herstellung stabiler Zellen ist zudem die richtige Zelldichte entscheidend. Zur Bestimmung wurden verschiedene Zelldichten ( $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ) 5-14 Tage inkubiert und die Konfluenz mikroskopisch betrachtet. Eine optimale Zelldichte lag vor, wenn eine ungefähr 80 %ige Konfluenz erzielt wurde bevor massiver Zelltod eintrat. Dies wurde bei einer Zelldichte von  $3 \times 10^6$  Zellen erreicht.

#### 4.1.2 Herstellung einer stabilen Tet-Off-Zelllinie

Für die Herstellung einer stabilen Tet-Off-Zelllinie wurde das Plasmid pTet-Off von Clontech in HEK293-Zellen transfiziert (siehe 3.3.8). Dieses Plasmid kodiert den Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator (tTA). Zum Screening von Zellen, die den Tet-Off-Transaktivator enthielten, wurden von verschiedenen Einzelkolonien (Klonen) Proteine gewonnen, diese in der SDS-Page aufgetrennt und dann mittels Western-Blot-Analyse mit dem Primärantikörper „TetR Monoclonal Antibody“ in einer Verdünnung von 1:1000 detektiert. Der Antikörper ist gegen den bakteriellen Tet-Repressor (TetR) Wildtyp gerichtet und kann zum Screening von Zelllinien genutzt werden, die den Tet-Off-, Tet-Off<sup>®</sup>-Advanced- oder Tet-On<sup>®</sup>-Advanced-

Transaktivator enthalten. Als Positivkontrolle wurden stabile HEK293-Tet-On-Zellen, als Negativkontrolle HEK293-Zellen aufgetragen.

Die Positivkontrolle zeigte, im Vergleich zur Negativkontrolle, die für das TetR Protein charakteristische Bande bei ca. 30 kDa (Abbildung 11 A). Eine derartige Bande beim Klon 21 lässt auf einen positiven Klon schließen (Abbildung 11 D). Eine Bande bei ca. 34 kDa, die bei Klon 10, 11 und 12 und schwach bei Klon 8 auftrat, spricht ebenfalls für eine Expression des gewünschten Proteins (Abbildung 11 B). Alle übrigen überprüften Klone waren negativ (Abbildung 11 A-D).



**Abbildung 11: Screening der Klone zum qualitativen Nachweis des Tet-Off-Transaktivators**

Western-Blot-Analyse mit den Zelllysaten von HEK293-Zellen, die mit dem Plasmid pTet-Off transfiziert wurden, mit dem monoklonalen Antikörper gegen den bakteriellen Tet-Repressor.

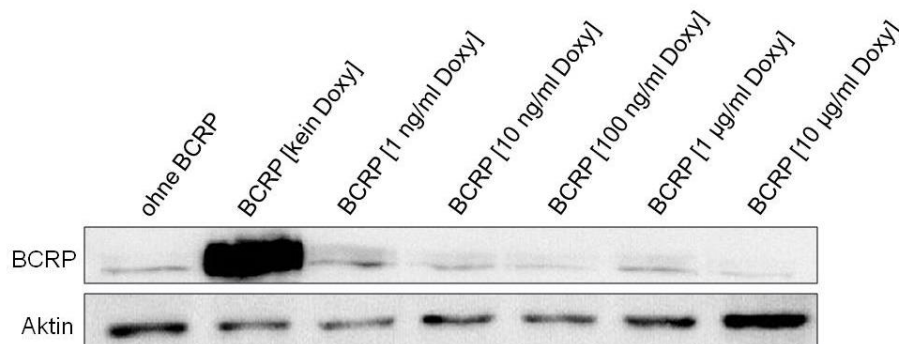
Um die Funktionalität der im Western Blot als positiv erscheinenden Klone zu untersuchen, wurden die Klone 10, 11, 12 und 21 transient mit dem bidirektionalen Plasmid pTRE-Tight-BI-AcGFP1-BCRP transfiziert. Durch Zugabe verschiedener Doxyzyklin-Konzentrationen (0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml) sollte im Durchflusszytometer nach ca. 72 h bei einem funktionsfähigen stabilen Klon die AcGFP1-Intensität, die mit der AcGFP1-Expression korreliert, abnehmen. Mit zunehmender Doxyzyklin-Konzentration kam es bei Klon 21 zu einer Abnahme der AcGFP1-Intensität. Der Median-Wert sank von 242.000 auf 7.500 (entspricht dem Wert nicht-transfizierter HEK293-Zellen), so dass dieser Klon als stabile Tet-Off-Zelllinie verwendet werden konnte.

## 4.2 Konzentrationsabhängiger Einfluss von Doxyzyklin auf das Tet-System

Mittels Western-Blot- und RNA-Analyse wurde bei der hergestellten stabilen HEK293-Tet-Off-Zelllinie und bei der von Clontech erworbenen stabilen HEK293-Tet-On<sup>®</sup>-Advanced-Zelllinie überprüft, welche Doxyzyklin-Konzentration für die Aktivierung des Tet-On-BCRP-Systems bzw. für die Inaktivierung des Tet-Off-BCRP-Systems nötig ist. Laut Herstellerangaben wird eine vollständige Aktivierung des Tet-On-Systems, je nach analysiertem Zelltyp, mit 0,1-1 µg/ml Doxyzyklin bzw. eine Inaktivierung des Tet-Off-Systems mit 0,01-1 µg/ml Doxyzyklin erreicht (Clontech Laboratories, 2005). Die Induktion bzw. Abnahme der BCRP-Expression und die Funktionalität des so exprimierten BCRP wurden mittels PhA-Efflux-Assay durchflusszytometrisch überprüft. Ob eine ausreichende Aktivierung des Tet-On-Systems bei den HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen bereits nach einer 24-stündigen oder erst nach einer 48-stündigen Induktion mit Doxyzyklin erzielt wird, wurde ebenfalls untersucht.

### 4.2.1 Doxyzyklin-regulierbare Expression von BCRP im Tet-Off-System

Das Ausmaß der BCRP-Proteinexpression wurde mittels Western Blot analysiert. Beta-Aktin wurde zur Normalisierung der Proteinbeladung herangezogen. Ohne Doxyzyklin wurde in transient transfizierten HEK293-Tet-Off-BCRP-Zellen eine sehr hohe BCRP-Expression erreicht (Abbildung 12). Nach Zugabe von 1 ng/ml oder höheren Konzentrationen Doxyzyklin kam es zu einer fast vollständigen Repression der BCRP-Expression (Abbildung 12).

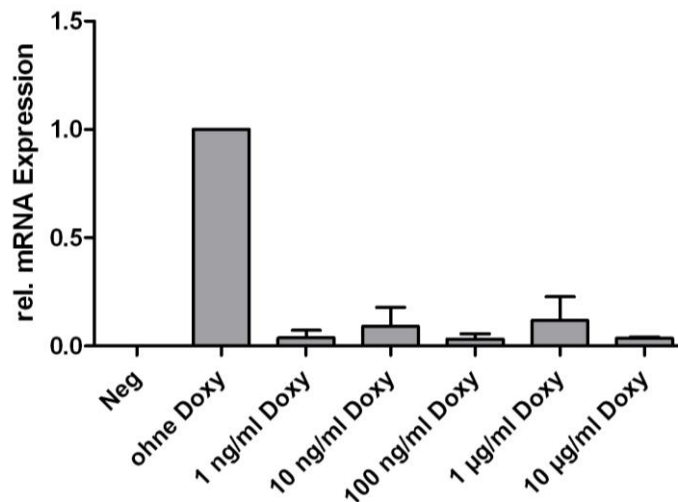


**Abbildung 12: Doxyzyklin-abhängige Proteinexpression von BCRP-Wildtyp in HEK293-Tet-Off-BCRP-Zellen**

Western-Blot-Analyse von BCRP-Wildtyp in Zelllysaten von transient transfizierten HEK293-Tet-Off-BCRP-Zellen mit den spezifischen Antikörpern gegen BCRP bzw. Beta-Aktin. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot mit der Proteinexpression von BCRP-Wildtyp nach Zugabe aufsteigender Doxyzyklin-Konzentrationen.

Das Expressionsniveau war in diesem Fall vergleichbar mit dem Expressionsniveau der Negativkontrolle, den untransfizierten HEK293-Tet-Off-Zellen.

Ähnliche Ergebnisse lieferte die RNA-Analyse (Abbildung 13), in der sich die relative mRNA-Expression bei Doxyzyklin-Konzentrationen  $> 1$  ng/ml der Nullexpression der Negativkontrolle annäherte.



**Abbildung 13: Doxyzyklin-abhängige relative mRNA-Expression von BCRP-Wildtyp in HEK293-Tet-Off-BCRP-Zellen**

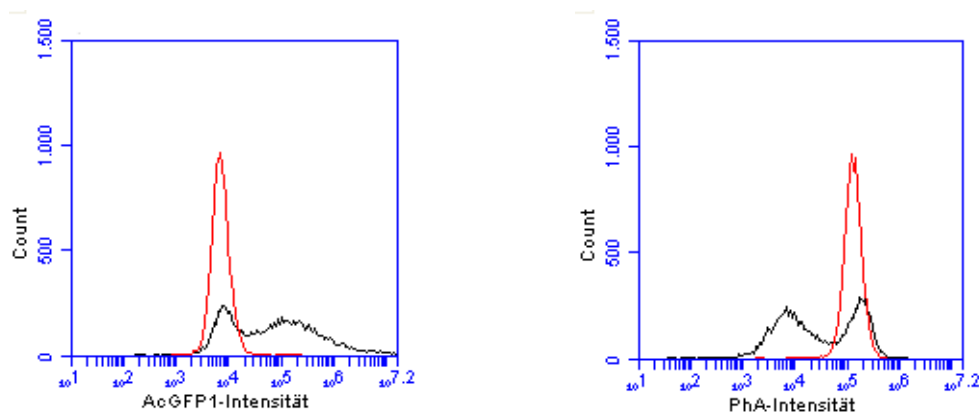
RT-PCR von BCRP-Wildtyp cDNA-Proben von transient transfizierten HEK293-Tet-Off-BCRP-Zellen. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von BCRP-Wildtyp nach Zugabe aufsteigender Doxyzyklin-Konzentrationen. Die BCRP mRNA-Expression wurde auf HPRT1 normalisiert.

Eine Konzentration von 1 ng/ml Doxyzyklin ist folglich für die Inaktivierung des Tet-Off-Systems ausreichend. Um eine annähernd vollständige Inaktivierung des Tet-Off-Systems zu gewährleisten, wurde eine erhöhte Doxyzyklin-Konzentration von 100 ng/ml für weiterführende Versuche ausgewählt.

Die Abnahme der BCRP-Expression mit steigenden Doxyzyklin-Konzentrationen sowie die Funktionalität von BCRP wurden weiterhin im durchflusszytometrisch analysierten PhA-Efflux-Assay untersucht, wobei die PhA-Intensität im Fluoreszenzkanal FL-4 ( $675 \pm 12,5$  nm) bzw. die AcGFP1-Intensität im Fluoreszenzkanal FL-1 ( $530 \pm 15$  nm) detektiert wurden. Es wurde ein Plasmid mit einem bidirektionalen TRE-Promoter verwendet, welches eine parallele Transkription von AcGFP1 und BCRP ermöglicht. Durch *Gaten* auf Zellen, die das Reportergen AcGFP1 exprimieren, können somit indirekt BCRP-exprimierende Zellen durchflusszytometrisch erfasst und analysiert werden. Hierbei verhält sich die BCRP-Expression umgekehrt proportional zur zellulären PhA-Intensität, da funktionelles BCRP PhA aus der Zelle

heraus transportiert und dadurch die PhA-Intensität intrazellulär vermindert wird. Die PhA-Intensität dient somit als Hinweis für die BCRP-Expression bzw. BCRP-Funktionalität. Wie zuvor in der Western-Blot- und RNA-Analyse gezeigt, ist das Tet-Off-BCRP-System ohne Doxyzyklin aktiviert und nach Zugabe von 100 ng/ml Doxyzyklin reprimiert, so dass nur diese Konzentrationen in Abbildung 14 berücksichtigt wurden.

Die PhA-Intensität in HEK293-Tet-Off-BCRP-Zellen war ohne Zugabe von Doxyzyklin am niedrigsten, weil hier funktionelles BCRP ausgeprägt exprimiert wurde. Mit steigenden Doxyzyklin-Konzentrationen nahm die PhA-Intensität im Sinne einer Repression der BCRP-Expression stark zu. Die AcGFP1-Intensität war dagegen ohne Doxyzyklin am höchsten und sank mit steigenden Doxyzyklin-Konzentrationen.



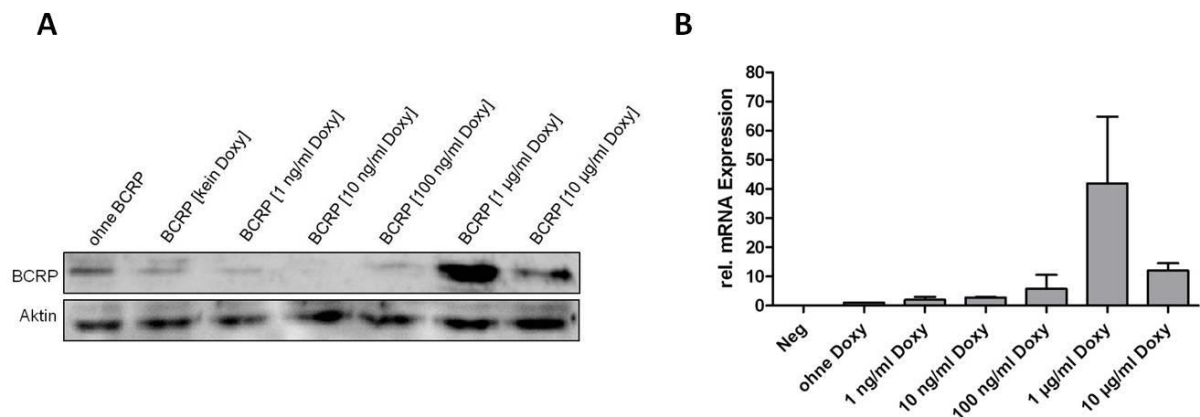
**Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse der dualen AcGFP1- und BCRP-Expression in HEK293-Tet-Off-BCRP-Zellen**

Durchflusszytometrischer PhA-Efflux-Assay in transient transfizierten HEK293-Tet-Off-BCRP-Zellen ohne Doxyzyklinzugabe (schwarz) und nach Zugabe von 100 ng/ml Doxyzyklin (rot) (n=2). Doxyzyklin führt zur Abnahme der AcGFP1-Expression und zur Zunahme der PhA-Intensität als Ausdruck der Repression der BCRP-Expression durch Doxyzyklin.

#### 4.2.2 Doxyzyklin-regulierbare Expression von BCRP im Tet-On-System

Um die optimale Proteinexpression und relative mRNA-Expression von BCRP mit Doxyzyklin zu ermitteln, wurde eine 24-stündige Inkubationszeit mit einer 48-stündigen Inkubationszeit verglichen. Im Western Blot war nach einer Inkubationszeit mit Doxyzyklin für 24 h bei 1 µg/ml Doxyzyklin das Maximum der BCRP-Expression in transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen erreicht (Abbildung 15 A). Niedrigere Doxyzyklin-Konzentrationen führten nicht zu einer ausreichenden BCRP-Expression. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml kam es zu einer Abnahme der BCRP-Expression. Bei den untransfizierten HEK293-Tet-On-

Zellen, die als Negativkontrolle dienten, war keine signifikante BCRP-Expression nachweisbar.



**Abbildung 15: Doxyzyklin-abhängige BCRP-Expression in HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen (24-stündige Inkubation)**

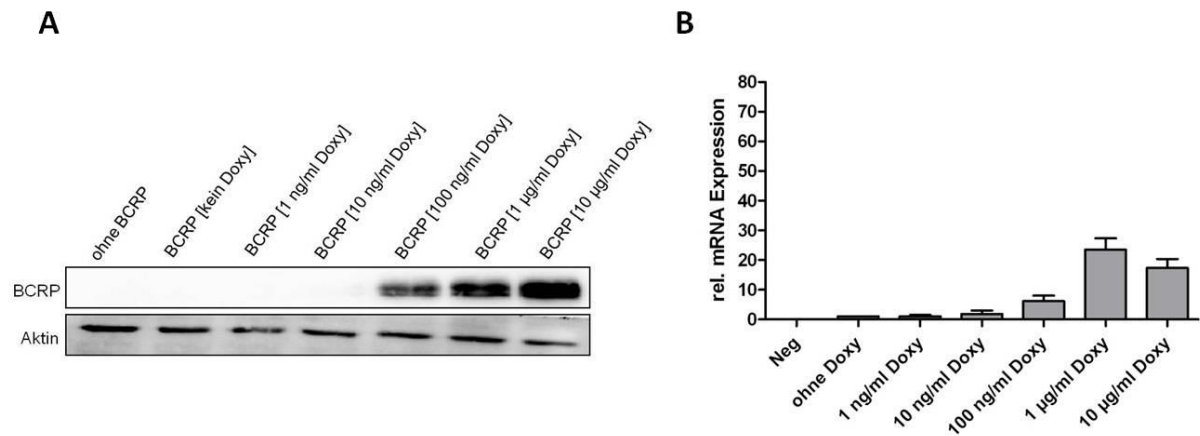
A: Western-Blot-Analyse von BCRP-Wildtyp in Zelllysaten von transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen mit den spezifischen Antikörpern gegen BCRP bzw. Beta-Aktin. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot mit der Proteinexpression von BCRP-Wildtyp nach Zugabe aufsteigender Doxyzyklin-Konzentrationen.

B: RT-PCR von BCRP-Wildtyp cDNA-Proben von transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von BCRP-Wildtyp nach Zugabe aufsteigender Doxyzyklin-Konzentrationen. Die mRNA-Expression wurde auf HPRT1 normalisiert.

Die RNA-Analyse bestätigte die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse, abgesehen von einer geringfügigen Zunahme der relativen mRNA-Expression von BCRP im Bereich unter 1 µg/ml Doxyzyklin (Abbildung 15 B).

Nach einer Inkubation mit Doxyzyklin für 48 h war bei der Western-Blot-Analyse ab 100 ng/ml Doxyzyklin ein signifikanter Anstieg der BCRP-Expression zu verzeichnen (Abbildung 16 A).





**Abbildung 16: Doxyzyklin-abhängige BCRP-Expression in HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen (48-stündige Inkubation)**

A: Western-Blot-Analyse von BCRP-Wildtyp in Zelllysaten von transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen mit den spezifischen Antikörpern gegen BCRP bzw. Beta-Aktin. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot mit der Proteinexpression von BCRP-Wildtyp nach Zugabe verschiedener Doxyzyklin-Konzentrationen.

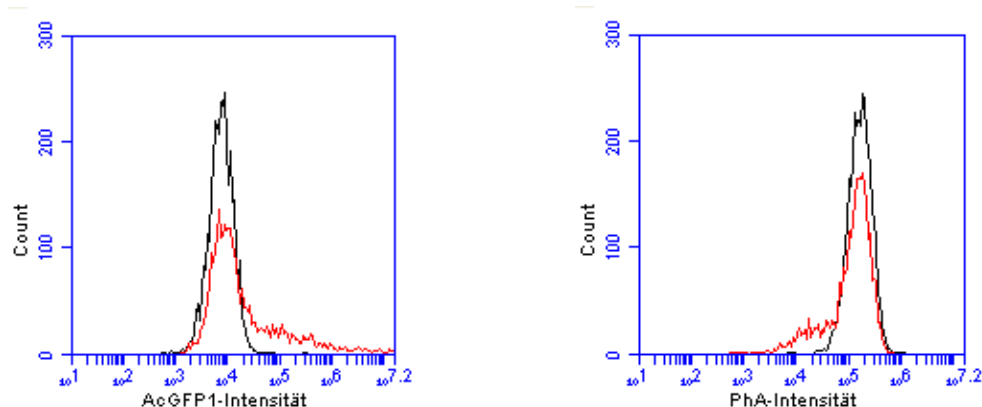
B: RT-PCR von BCRP-Wildtyp cDNA-Proben von transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression von BCRP-Wildtyp nach Zugabe aufsteigender Doxyzyklin-Konzentrationen. Die BCRP mRNA-Expression wurde auf HPRT1 normalisiert.

In der RNA-Analyse nahm die relative mRNA-Expression von BCRP mit steigenden Doxyzyklin-Konzentrationen bis zu einem Maximum bei 1 µg/ml Doxyzyklin zu (Abbildung 16 B).

Beim Vergleich der Inkubationszeiten wurde nach Zugabe von Doxyzyklin für 24 h die maximale Proteinexpression und die relative mRNA-Expression von BCRP bei 1 µg/ml Doxyzyklin erreicht. Nach Zugabe von Doxyzyklin für 48 h wurde auch bei der relativen mRNA-Expression von BCRP das Maximum bei 1 µg/ml erzielt, wohingegen die Proteinexpression bei 10 µg/ml am höchsten war. Insgesamt lag bei der Inkubation mit Doxyzyklin für 24 h eine höhere relative mRNA-Expression von BCRP im Vergleich zur Inkubation mit Doxyzyklin für 48 h vor. Beim Tet-On-System wurden deshalb 1 µg/ml als geeignete Doxyzyklin-Konzentration und eine 24-stündige Inkubation mit Doxyzyklin ausgewählt.

Die Induktion der BCRP-Expression mit steigenden Doxyzyklin-Konzentrationen sowie die Funktionalität von BCRP wurden auch in der durchflusszytometrischen Analyse mittels PhA-Efflux-Assay untersucht. Wie zuvor in der Western-Blot- und RNA-Analyse gezeigt, kann bei Doxyzyklin-Konzentrationen von 1 µg/ml bzw. 0 ng/ml von einem aktivierten bzw. reprimierten Tet-On-BCRP-System ausgegangen

werden. Aus diesem Grund wurden nur diese Konzentrationen in Abbildung 17 berücksichtigt.



**Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der dualen AcGFP1- und BCRP-Expression in HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen**

Durchflusszytometrischer PhA-Efflux-Assay in transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen ohne Zugabe von Doxyzyklin (schwarz) und nach Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin (rot) (n=2). Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin führt zur AcGFP1-Expression und Abnahme der PhA-Intensität als Ausdruck der Aktivierung der BCRP-Expression durch Doxyzyklin.

Nach Zugabe von Doxyzyklin trat eine verringerte PhA-Intensität auf, wohingegen die AcGFP1-Intensität anstieg. Die Assays verdeutlichen somit, dass im Gegensatz zum Tet-Off-System, erst mit steigenden Doxyzyklin-Konzentrationen funktionelles BCRP exprimiert wird.

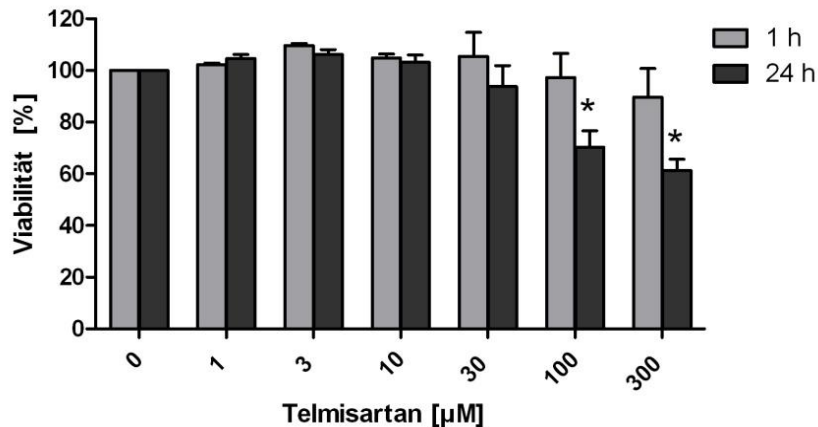
#### 4.2.3 Vergleich der Doxyzyklin-regulierbaren Expression im Tet-On- und Tet-Off-System

Die Funktionalität beider Tet-Systeme konnte durch eine in Abhängigkeit der Doxyzyklinzugabe veränderte BCRP-Expression nachgewiesen werden. Für weitere Versuche wurde das Tet-On-System verwendet, da hier ohne Zusatz von Doxyzyklin ein inaktiver Zustand des Gens gewährleistet ist und das Gen für die Versuche mit Doxyzyklin aktiviert und im Assay erneut aus dem experimentellen System entfernt werden kann.

#### 4.3 Einfluss von Telmisartan auf die Zellviabilität

Um den Einfluss von Telmisartan auf die Viabilität von HEK293-Tet-On-Zellen zu verifizieren, wurde der MTT-Test angewendet. Es wurde die maximale Konzentration von Telmisartan ermittelt, die bei Inkubationszeiten mit Telmisartan von 1 h oder 24 h

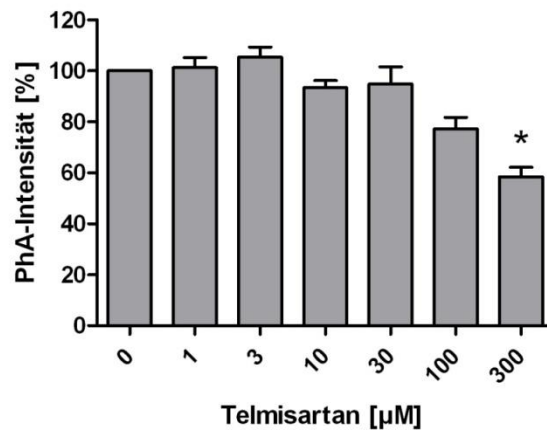
nicht zu einer Veränderung der Zellviabilität führte. Bei einer Inkubation mit Telmisartan für 1 h zeigten sich noch keine signifikanten Veränderungen in der Zellviabilität der HEK293-Tet-On-Zellen (Abbildung 18). Eine signifikante Abnahme der Zellviabilität trat erst bei einer Inkubationszeit von Telmisartan für 24 h bei einer Telmisartan-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  und höher auf. Die ermittelte Zellviabilität lag bei 100  $\mu\text{M}$  Telmisartan bei 64 % und bei 300  $\mu\text{M}$  nur noch bei 57 %.



**Abbildung 18: MTT-Test mit Telmisartan-Inkubationen von 1 h oder 24 h**

Die Zellviabilität von Telmisartan in untransfizierten HEK293-Tet-On-Zellen wurde mittels MTT-Test untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert der Zellviabilität in Prozent von 4 bzw. 5 Messwerten von 3 unabhängigen Versuchen,  $p < 0,05$  ohne Telmisartan vs. 100  $\mu\text{M}$  Telmisartan bzw. 300  $\mu\text{M}$  Telmisartan.

Um zu überprüfen, ob Telmisartan im PhA-Efflux-Assay auch Effekte auf untransfizierte HEK293-Tet-On-Zellen aufweist, wurde die PhA-Intensität bei unterschiedlichen Telmisartan-Konzentrationen verglichen. Bei 100  $\mu\text{M}$  Telmisartan nahm die PhA-Intensität von 100 % auf 77 % und bei 300  $\mu\text{M}$  Telmisartan auf 58 % ab (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Einfluss von Telmisartan auf untransfizierte HEK293-Tet-On-Zellen**

Durchflusszytometrischer PhA-Efflux-Assay in untransfizierten HEK293-Tet-On-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenz (PhA-Intensität) von 5 unabhängigen Versuchen.  $p < 0,05$  TMT [0 µM] vs. TMT [300 µM].

Dieser unspezifische Effekt von Telmisartan zeigte sich auch in transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen ohne Doxyzyklinzugabe (graphisch nicht dargestellt).

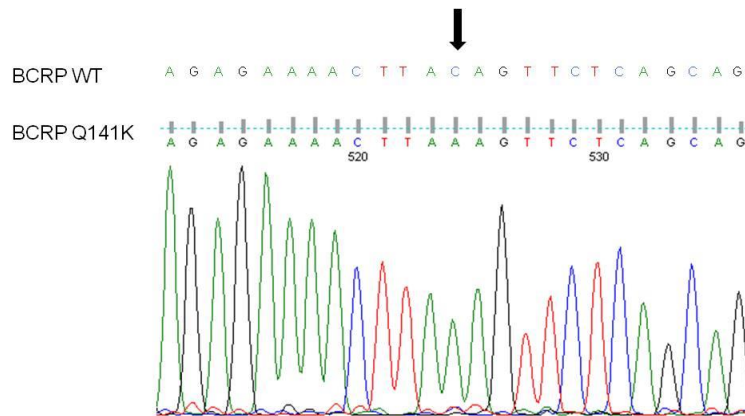
Für weitere Versuche wurden daher nur Telmisartan-Konzentrationen bis einschließlich 100 µM Telmisartan in Verbindung mit einer einstündigen Inkubation (wie beim PhA-Efflux-Assay) verwendet, da beim MTT-Test mit dieser Kombination keine toxischen Effekte auftraten.

#### 4.4 Charakterisierung von BCRP-Mutanten in transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen

##### 4.4.1 Generierung und Überprüfung von BCRP-Mutanten

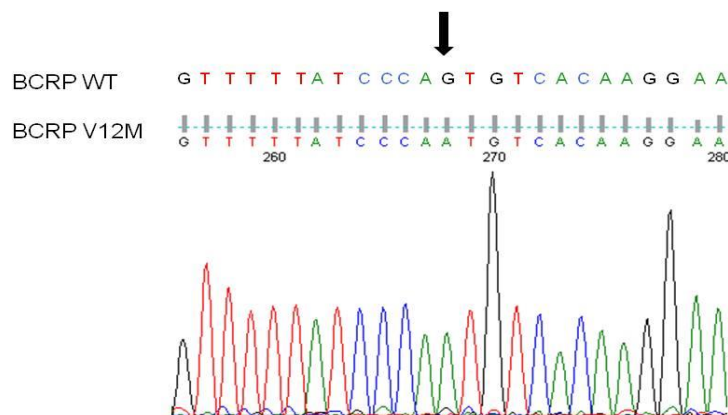
Um die Auswirkung von genetischen Mutanten auf den inhibitorischen Effekt von Telmisartan auf die BCRP-Funktion zu untersuchen, wurden im klonierten und validierten BCRP-Wildtyp-Responderkonstrukt die Mutanten Q141K, V12M, R482G, F431L, F489L und S248P mit den jeweiligen Primern (siehe 3.1.8) mit Hilfe des Mutagenese-Reagenziensystems „QuikChange<sup>®</sup> Lightning Site-Directed-Mutagenesis“ generiert. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung bei der Firma GATC (Konstanz) überprüft. In den nachfolgenden Abbildungen sind jeweils das Chromatogramm der Sequenzierung und die Nukleotidsequenz vor und nach der Einführung der Mutation dargestellt.

Für die Mutante Q141K bestätigte die Sequenzierung die erfolgreiche Mutation von Glutamin (Basenfolge CAG) zu Lysin (Basenfolge AAG). Die Nukleinbase C an Position 421 wurde gegen die Nukleinbase A ausgetauscht (Abbildung 20).



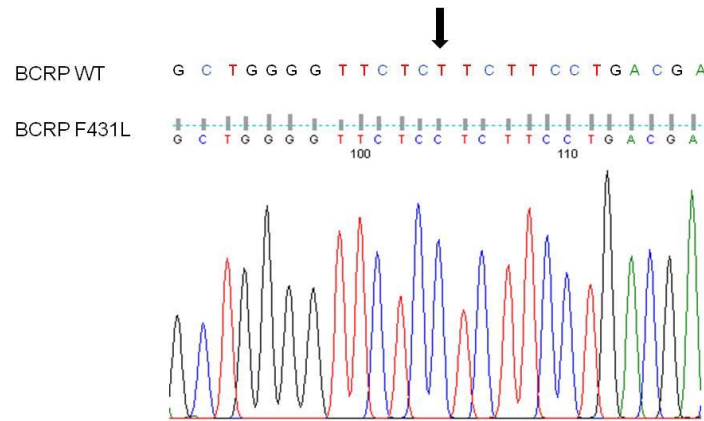
**Abbildung 20:** Oben Nukleotidsequenz des BCRP-Wildtyps, darunter Nukleotidsequenz der BCRP-Mutante Q141K und dazugehöriges Chromatogramm nach erfolgreicher Mutagenese. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung.

Bei der Mutante V12M zeigte das Chromatogramm den erfolgreichen Austausch der Nukleinbase G in der Basenfolge GTG (kodiert für Valin) gegen die Nukleinbase A in der Basenfolge ATG (kodiert für Methionin) (Abbildung 21).



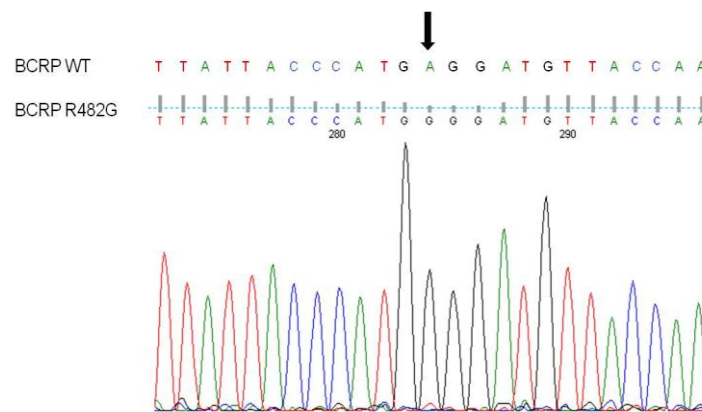
**Abbildung 21:** Oben Nukleotidsequenz des BCRP-Wildtyps, darunter Nukleotidsequenz der BCRP-Mutante V12M und dazugehöriges Chromatogramm nach erfolgreicher Mutagenese. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung.

Bei der Mutante BCRP F431L wurde Phenylalanin (Basenfolge TTC) zu Leucin (Basenfolge CTC) mutiert, indem ein Austausch der Nukleinbase T gegen C erfolgte (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Oben Nukleotidsequenz des BCRP-Wildtyps, darunter Nukleotidsequenz der BCRP-Mutante F431L und dazugehöriges Chromatogramm nach erfolgreicher Mutagenese. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung.

Für die R482G-Mutante bestätigte das Chromatogramm der Sequenzierung den erfolgreichen Tausch der Nukleinbase A in der Basenfolge AGG (kodiert für Arginin) zur Nukleinbase G in der Basenfolge GGG (kodiert für Glycin) (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Oben Nukleotidsequenz des BCRP-Wildtyps, darunter Nukleotidsequenz der BCRP-Mutante R482G und dazugehöriges Chromatogramm nach erfolgreicher Mutagenese. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung.

Für die F489L-Mutante zeigten die Sequenzierungsergebnisse, dass Phenylalanin (Basenfolge TTC) zu Leucin (Basenfolge CTC) mutiert wurde. Dazu wurde die Nukleinbase T gegen die Nukleinbase C ausgetauscht (Abbildung 24).

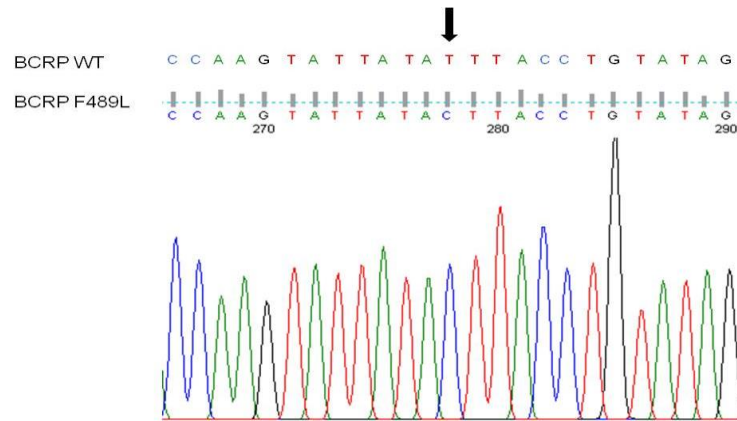


Abbildung 24: Oben Nukleotidsequenz des BCRP-Wildtyps, darunter Nukleotidsequenz der BCRP-Mutante F489L und dazugehöriges Chromatogramm nach erfolgreicher Mutagenese. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung.

Das Sequenzierergebnis der S248P-Mutante bestätigte die erfolgreiche Mutation der Aminosäure Serin (Basenfolge: TCC) zu Prolin (Basenfolge: CCC), in dem in der Basenfolge TCC die Nukleinbase T gegen C ausgetauscht wurde (Abbildung 25).

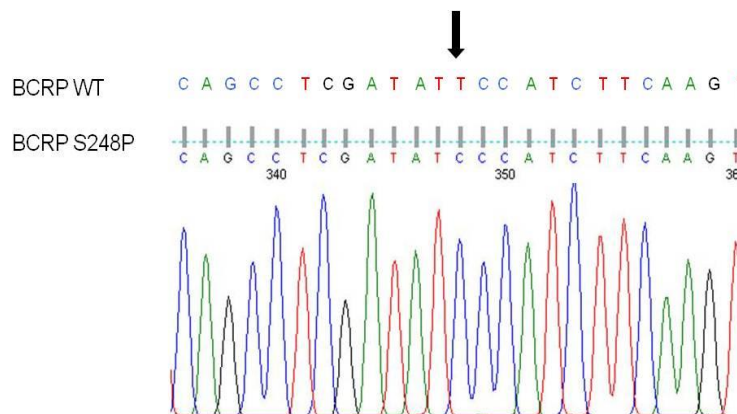
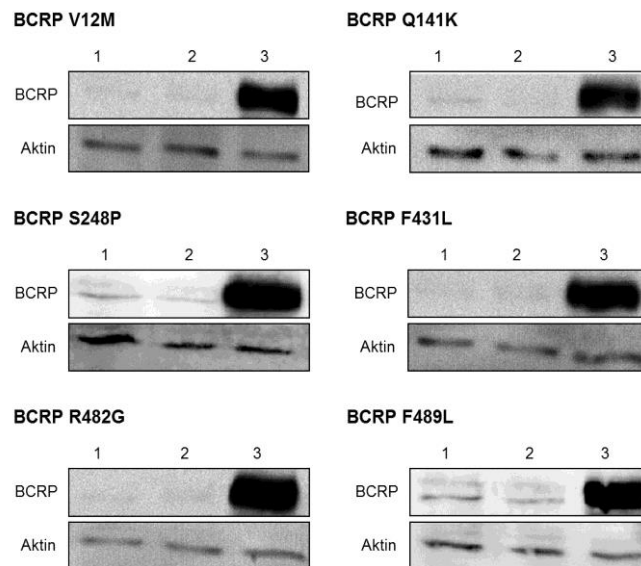


Abbildung 25: Oben Nukleotidsequenz des BCRP-Wildtyps, darunter Nukleotidsequenz der BCRP-Mutante S248P und dazugehöriges Chromatogramm nach erfolgreicher Mutagenese. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung.

#### 4.4.2 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse der BCRP-Mutanten diente primär zur Überprüfung der Funktionalität des Tet-On-Systems. Diese zeigte sich durch eine ausgeprägte BCRP-Expression bei einer Konzentration von 1 µg/ml Doxyzyklin (Abbildung 26).

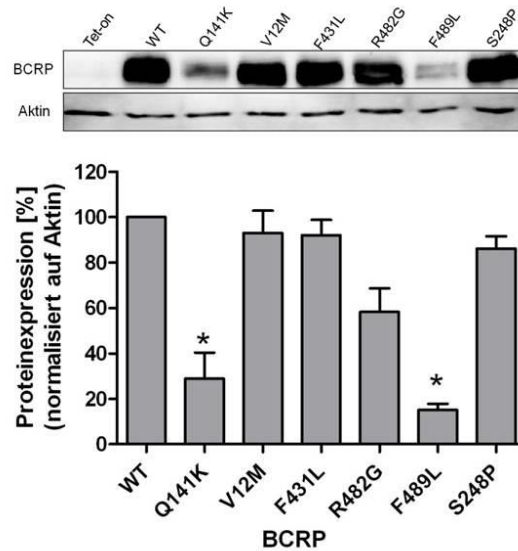


**Abbildung 26: Quantifizierung der Proteinexpression verschiedener BCRP-Mutanten in HEK293-Tet-On-Zellen**

Western-Blot-Analyse von BCRP-Wildtyp und den BCRP-Mutanten in den Zelllysaten von transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Wildtyp-Zellen und HEK293-Tet-On-BCRP-Mutanten-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen BCRP bzw. Beta-Aktin; 1: untransfizierte HEK293-Tet-On-Zellen, 2: transfizierte HEK293-Tet-On-Zellen ohne Doxyzyklin, 3: transfizierte HEK293-Tet-On-Zellen mit 1 µg/ml Doxyzyklin.

Um den Einfluss der veränderten BCRP-Aminosäure-Sequenz auf die Proteinexpression der verschiedenen Mutanten zu untersuchen, wurde die BCRP-Proteinexpression der Zelllysate von BCRP-Wildtyp und den verschiedenen BCRP-Mutanten in transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen verglichen. Die Proteinexpression der Mutanten Q141K und F489L war im Vergleich zum BCRP-Wildtyp signifikant vermindert (Abbildung 27). Die densitometrische Auswertung von vier Versuchen bestätigte diesen Befund. Die Proteinexpression wurde auf Beta-Aktin normalisiert und das Expressionsniveau von BCRP-Wildtyp wurde gleich 100 % gesetzt.



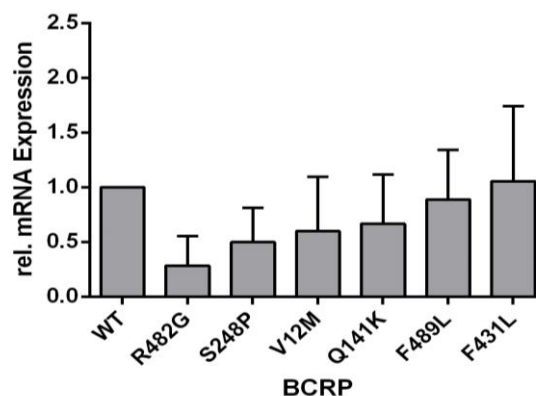


**Abbildung 27: Expressionsniveau von BCRP-Wildtyp und BCRP-Mutanten**

Western-Blot-Analyse von BCRP-Wildtyp und BCRP-Mutanten in Zelllysaten von transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Wildtyp-Zellen und HEK293-Tet-On-BCRP-Mutanten-Zellen, die mit 1 µg/ml Doxyzyklin für 24 h behandelt wurden. Oben: repräsentativer Western Blot, unten: densitometrische Auswertung von 4 unabhängigen Versuchen, p < 0,05 BCRP-Wildtyp vs. Q141K- bzw. F489L-Mutante.

#### 4.4.3 RNA-Analyse

Zur Untersuchung des Einflusses der BCRP-Mutationen auf die mRNA-Expression bzw. -Stabilität wurde die relative mRNA-Expression von BCRP-Wildtyp und den BCRP-Mutanten nach Doxyzyklin-vermittelter Induktion mittels Real-Time-PCR-Analyse verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der relativen mRNA-Expression der BCRP-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 28).



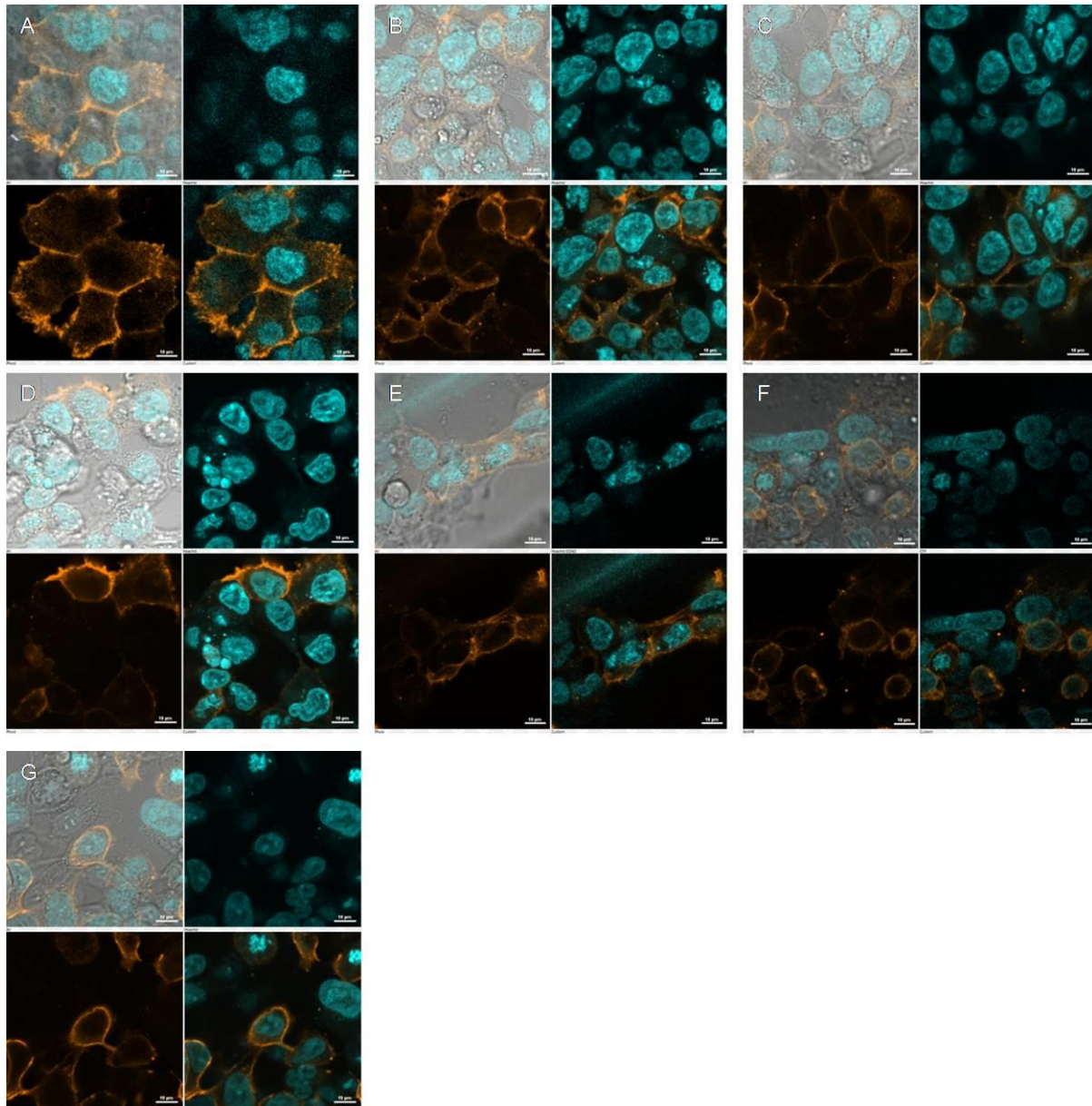
**Abbildung 28: Relative BCRP-mRNA-Expression von BCRP-Wildtyp und BCRP-Mutanten**

RT-PCR von cDNA-Proben von BCRP-Wildtyp und BCRP-Mutanten von transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Wildtyp-Zellen und HEK293-Tet-On-BCRP-Mutanten-Zellen. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression nach Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin von 3 unabhängigen Versuchen. Die mRNA-Expression wurde auf HPRT1 normalisiert.

#### 4.4.4 Immunfluoreszenz-Analysen

Da es sich bei ABC-Transportern, wie dem BCRP, um membranständige Effluxpumpen handelt (Bart et al., 2004), wurde untersucht, ob die generierten BCRP-Mutanten eine membranständige Lokalisation aufwiesen. Dazu wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt.

Für alle untersuchten Mutanten von BCRP konnte eine membranständige Lokalisation beobachtet werden (Abbildung 29 A-G).

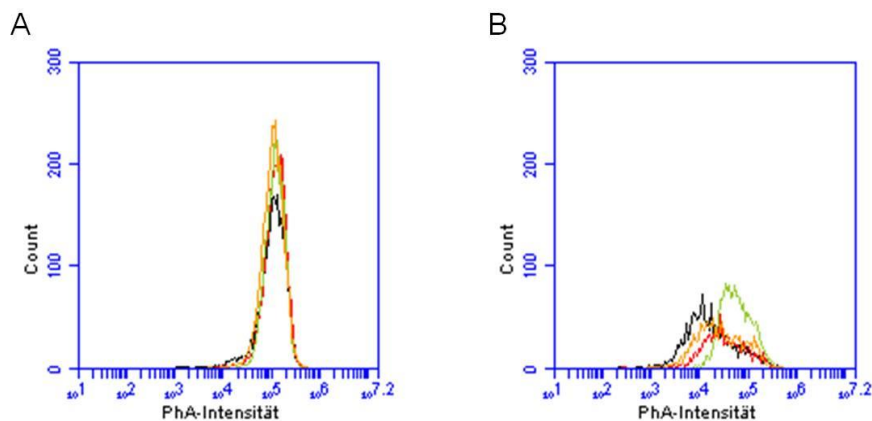


**Abbildung 29: Immunfluoreszenz-Analyse aller untersuchten BCRP-Mutanten und von BCRP-Wildtyp**

A: BCRP-Wildtyp, B: Q141K, C: V12M, D: F431L, E: R482G, F: F489L, G: S248P, links oben: die jeweiligen Zellen, rechts oben: die Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342, links unten: BCRP-assozierte Immunfluoreszenz (orange), rechts unten: jeweiliges Fusionsbild von BCRP-assoziierter Immunfluoreszenz und Hoechst 33342-Färbung.

#### 4.4.5 Charakterisierung der Transportkapazität von BCRP-Wildtyp und BCRP-Mutanten

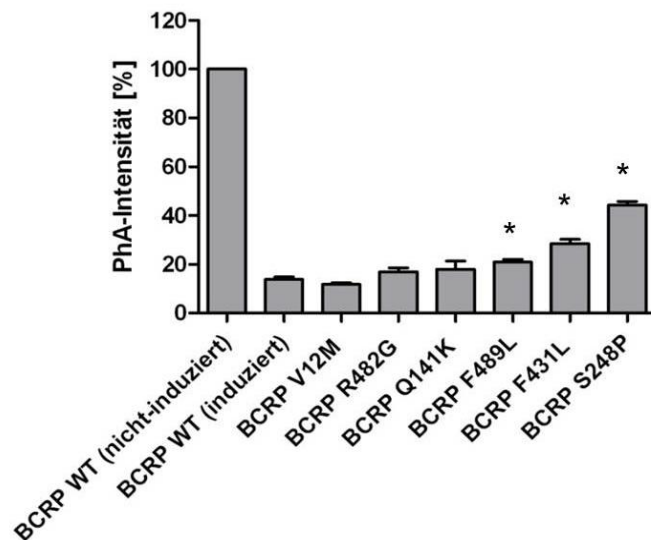
Im gewählten experimentellen System zeigte sich bei einigen der generierten Mutanten eine bereits basal reduzierte PhA-Transportkapazität. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde in einem transienten Transfektionsansatz simultan sowohl BCRP-Wildtyp-Responderkonstrukte als auch BCRP-Mutanten-Responderkonstrukte in HEK293-Tet-On-Zellen eingebracht und der PhA-Efflux in nicht-induzierten und induzierten Zellen analysiert. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass die PhA-Akkumulation in nicht-induzierten Zellen aller Genotypen vergleichbar war (Abbildung 30 A). In induzierten Zellen hingegen war die PhA-Akkumulation in den Mutanten F489L, F431L und S248P signifikant verstärkt (Abbildung B). Diese BCRP-Mutanten besitzen daher eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte PhA-Transportkapazität.



**Abbildung 30: PhA-Transportkapazität**

Durchflusszytometrische Untersuchung des PhA-Effluxes in nicht-induzierten und induzierten HEK293-Tet-On-BCRP-Wildtyp-Zellen und HEK293-Tet-On-BCRP-Mutanten-Zellen. Dargestellt ist die PhA-Intensität in (A) nicht-induzierten vs. (B) induzierten HEK293-Tet-On-Zellen bei BCRP-Wildtyp (schwarz) und den BCRP-Mutanten BCRP F489L (orange), BCRP F431L (rot) und BCRP S248P (grün) (n=3).

Abbildung 31 zeigt die statistische Auswertung der gemittelten PhA-Intensitäten getrennt nach untersuchtem BCRP-Genotyp.



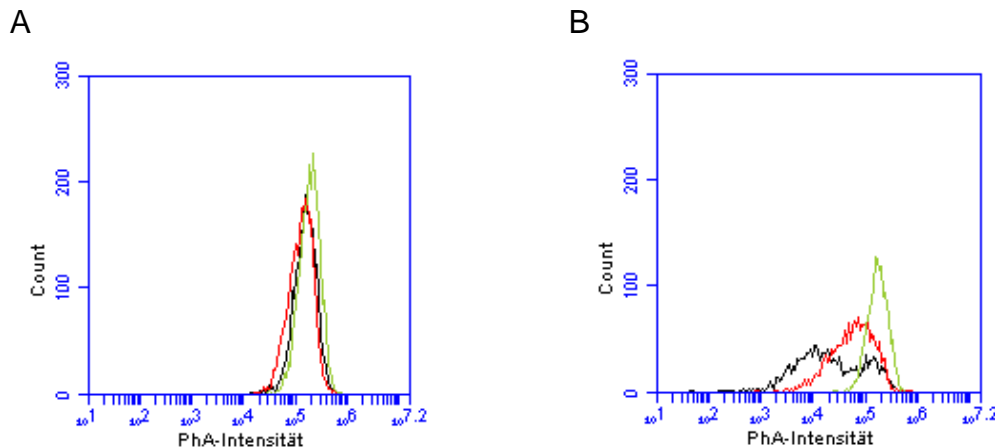
**Abbildung 31: PhA-Transportkapazität nach BCRP-Genotyp**

Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären PhA-Intensität in mit BCRP-Wildtyp- bzw. BCRP-Mutanten-Responderkonstrukten transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen (n=3 für jeden untersuchten Genotyp).  $p < 0,05$  BCRP WT (induziert) vs. BCRP F489L, BCRP F431L bzw. BCRP S248P.

Die erniedrigte Transportkapazität der BCRP-Mutanten F489L, F431L und S248P spiegelte sich in einer signifikant höheren zellulären PhA-Intensität wider.

#### 4.4.6 Durchflusszytometrische Analyse der Funktion von BCRP-Mutanten und ihrer Interaktion mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Telmisartan

Mittels PhA-Efflux-Assay wurde der Einfluss der BCRP-Mutationen auf die Funktionalität des ABC-Transporters und die Interaktion von Telmisartan mit dem ABC-Transporter in transient transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen untersucht. Als Positivkontrolle für die Inhibition von BCRP wurde Fumitremorgin C (FTC), ein spezifischer und potenter Inhibitor von BCRP, verwendet (Rabindran et al., 2000). In nicht-induzierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen, welche kein BCRP exprimieren, zeigte die Überlagerung der durchflusszytometrischen Histogramme, dass die PhA-Intensität in diesen Zellen vergleichbar war und dass Telmisartan und FTC in den gewählten Konzentrationen keinen Einfluss auf die PhA-Akkumulation in den Zellen hatten (Abbildung 32 A). Telmisartan und FTC zeigten also keine unspezifischen Effekte auf die „BCRP-freien“ HEK293-Tet-On-Zellen.

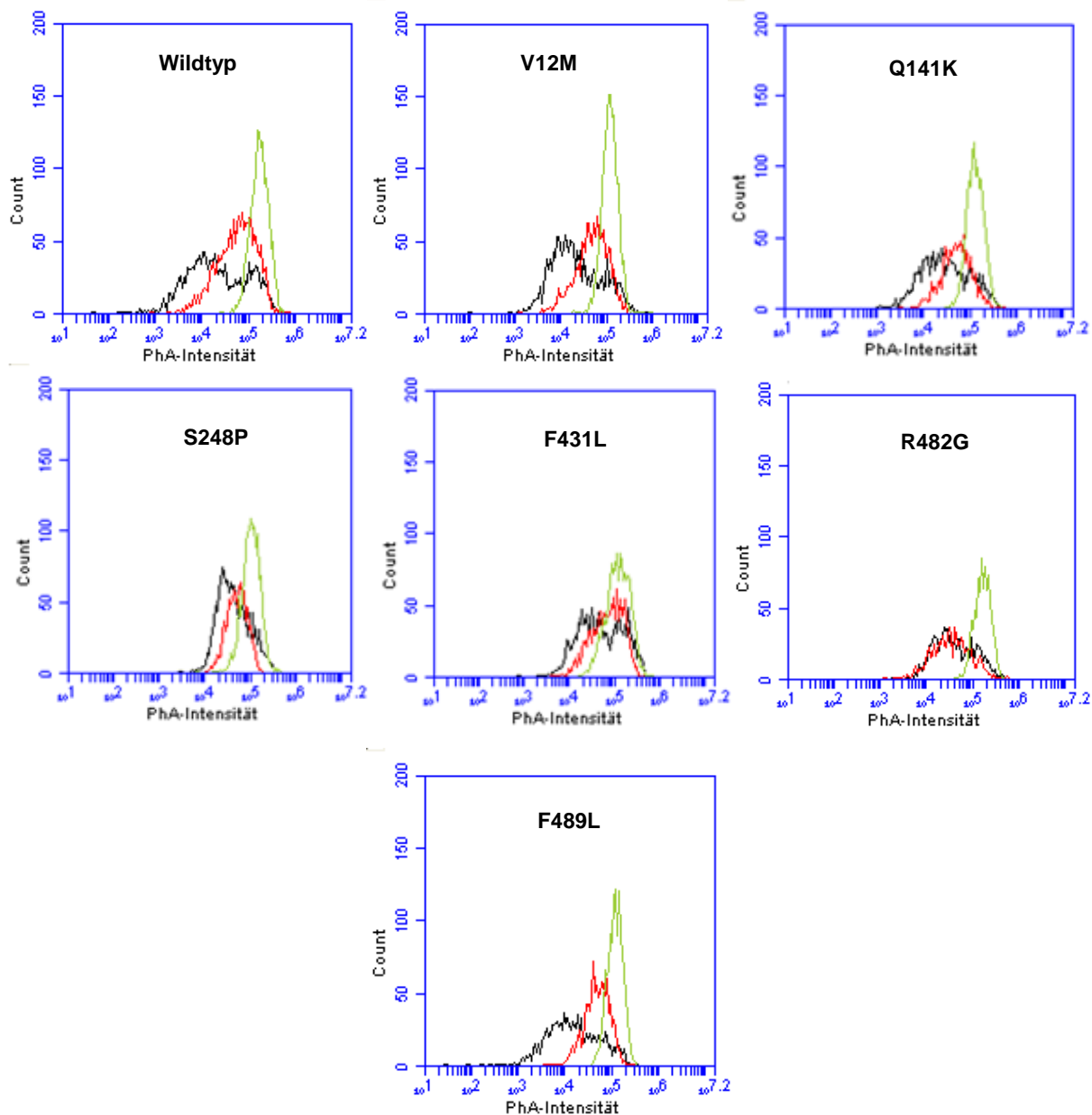


**Abbildung 32: Untersuchung des Einflusses von Telmisartan und FTC auf die PhA-Akkumulation in HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen**

Logarithmische Darstellung der PhA-Intensität in mit pTRE-Tight-BI-AcGFP1-BCRP transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen ohne Doxyzyklin (A) und mit Doxyzyklin (B) inkubiert in Abwesenheit eines Inhibitors (schwarz) und in Anwesenheit von 100 µM Telmisartan (rot) bzw. 10 µM FTC (grün).

In den mit Doxyzyklin-induzierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen, die den BCRP-Wildtyp exprimieren, verstärkten Telmisartan und FTC die PhA-Akkumulation. Dies wurde in einer Rechtsverschiebung der Fluoreszenzintensitätskurven und damit in einer höheren Fluoreszenzintensität deutlich (Abbildung 32 B). Die verstärkte PhA-Akkumulation entspricht einem verminderten Transport von PhA aus der Zelle, was bei einer Inhibition von BCRP zu erwarten ist (Weiss et al., 2010). Die Erhöhung der PhA-Fluoreszenzintensität ist umso größer, je ausgeprägter die Hemmung des PhA-Effluxes ausfällt. Die inhibitorische Effizienz von FTC (10 µM) war im gewählten experimentellen System somit höher als die von 100 µM Telmisartan.

Telmisartan zeigte an den BCRP-Mutanten Q141K, V12M, F431L und S248P eine mit dem Wildtyp vergleichbare inhibitorische Potenz und Effizienz (Abbildung 33). An der BCRP-Mutante F489L war die inhibitorische Potenz von Telmisartan hingegen im Vergleich zu BCRP-Wildtyp erhöht (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Untersuchung des Einflusses von 100  $\mu$ M Telmisartan und 10  $\mu$ M FTC auf die PhA-Intensität von BCRP-Wildtyp und BCRP-Mutanten**

Logarithmische Darstellung der PhA-Intensität in mit BCRP-Wildtyp und den jeweiligen BCRP-Mutanten transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen in Abwesenheit eines Inhibitors (schwarz), bzw. in Anwesenheit von 100  $\mu$ M Telmisartan (rot) bzw. 10  $\mu$ M FTC (grün).

Hingegen war der inhibitorische Effekt von Telmisartan an der R482G-Mutante auch bei hohen Telmisartan-Konzentrationen fast vollständig aufgehoben. Dies deutet darauf hin, dass Telmisartan mit dieser Mutante nicht mehr oder nur geringfügig interagieren und so keinen inhibitorischen Effekt mehr ausüben kann.

Der Referenzinhibitor FTC zeigte jedoch an BCRP-Wildtyp und allen BCRP-Mutanten eine inhibitorische Wirkung (Abbildung 33).

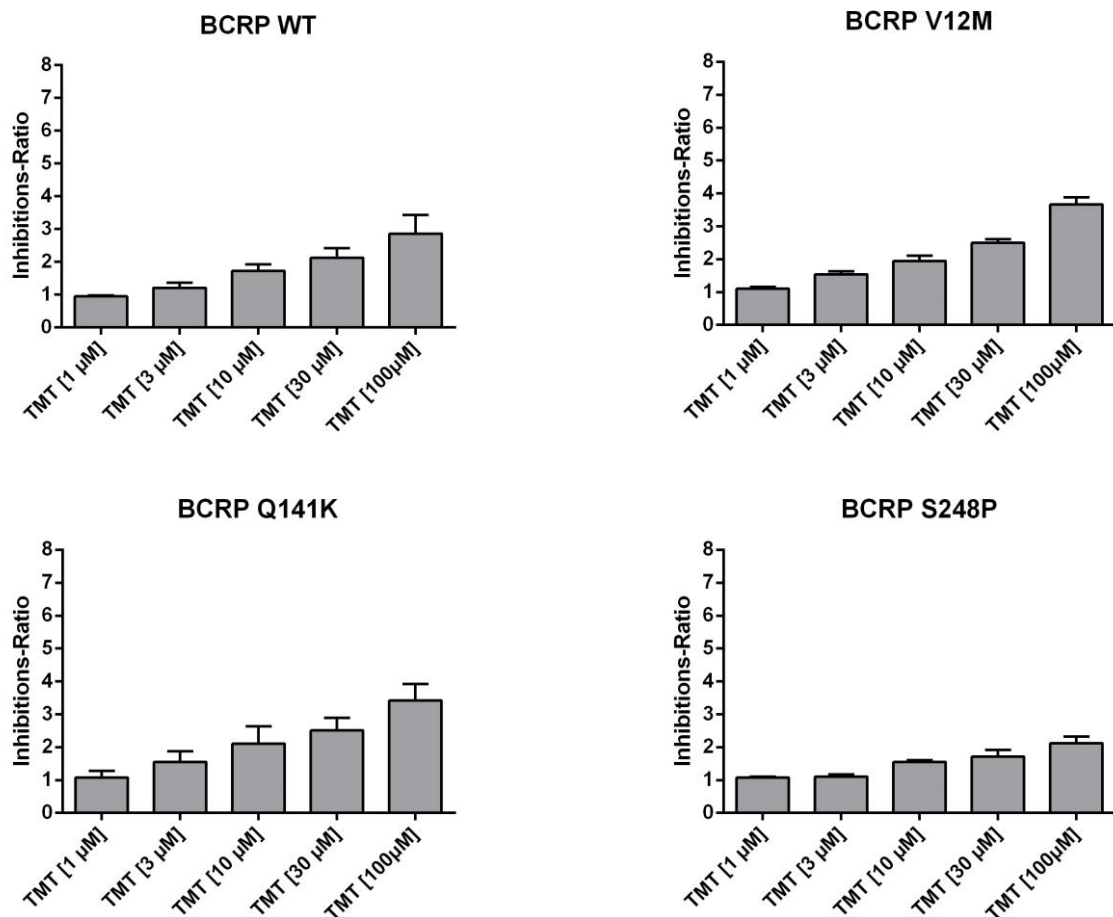


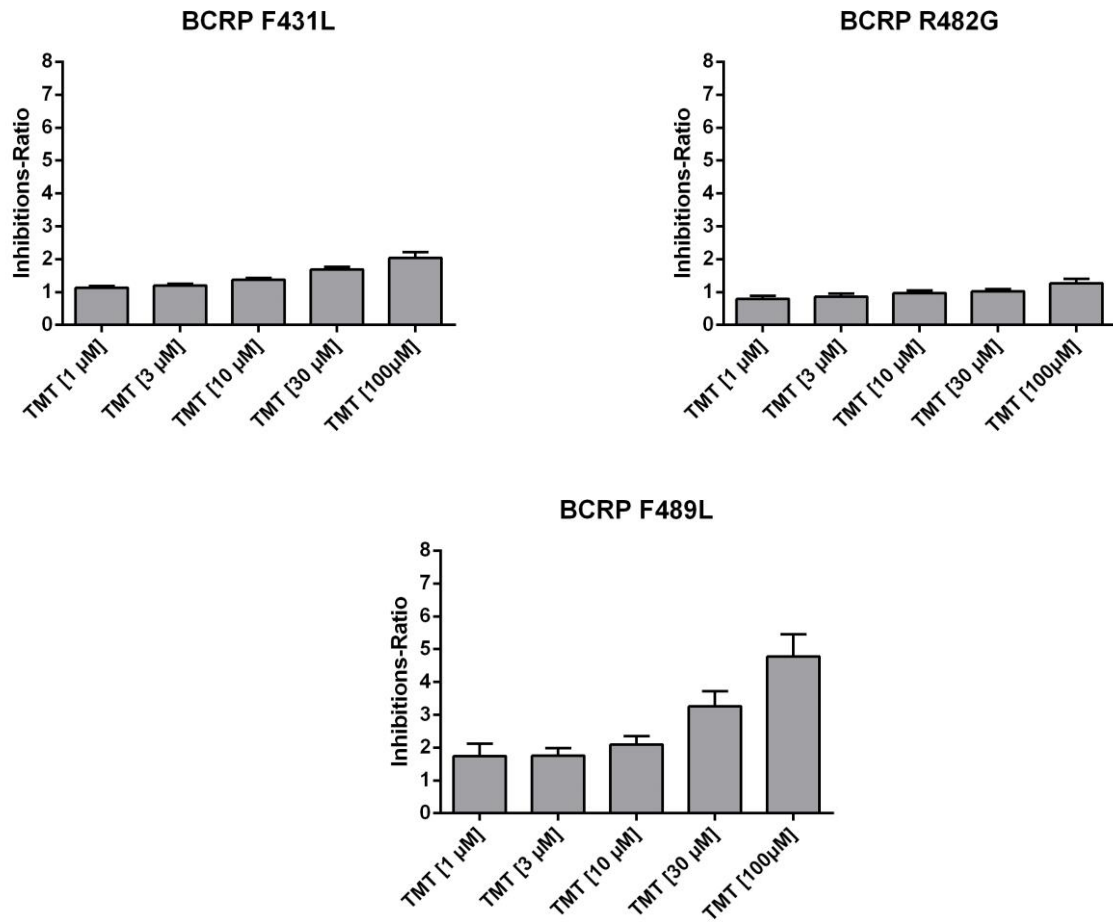
Der inhibitorische Effekt von Telmisartan wurde durch die Berechnung der sogenannten Inhibitions-Ratio quantifiziert:

$$IR = \frac{\frac{MF_{is}}{MF_i}}{\frac{MF_{nis}}{MF_{ni}}} \quad (1)$$

Die Inhibitions-Ratio gibt Auskunft über das Verhältnis der mittleren Fluoreszenz in induzierten ( $MF_i$ ) und nicht-induzierten Zellen ( $MF_{ni}$ ). Bei einem inhibitorischen Effekt der Testsubstanz ( $MF_{is}$  bzw.  $MF_{nis}$ ) ist die Inhibitions-Ratio größer als eins.

Telmisartan wies eine konzentrationsabhängige Inhibition beim BCRP-Wildtyp und den BCRP-Mutanten Q141K, V12M, F431L, F489L und S248P auf (Abbildung 34). Die inhibitorische Potenz von Telmisartan an der F489L-Mutante war jedoch stärker ausgeprägt als beim BCRP-Wildtyp. Dies zeigte sich an einer höheren Inhibitions-Ratio (Abbildung 34).





**Abbildung 34: Untersuchung des inhibitorischen Effekts von Telmisartan auf BCRP-Wildtyp und BCRP-Mutanten**

Darstellung der Inhibitions-Ratio in mit BCRP-Wildtyp und den jeweiligen BCRP-Mutanten transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen nach Zugabe steigender Telmisartan-Konzentrationen (n=3 bis 4).

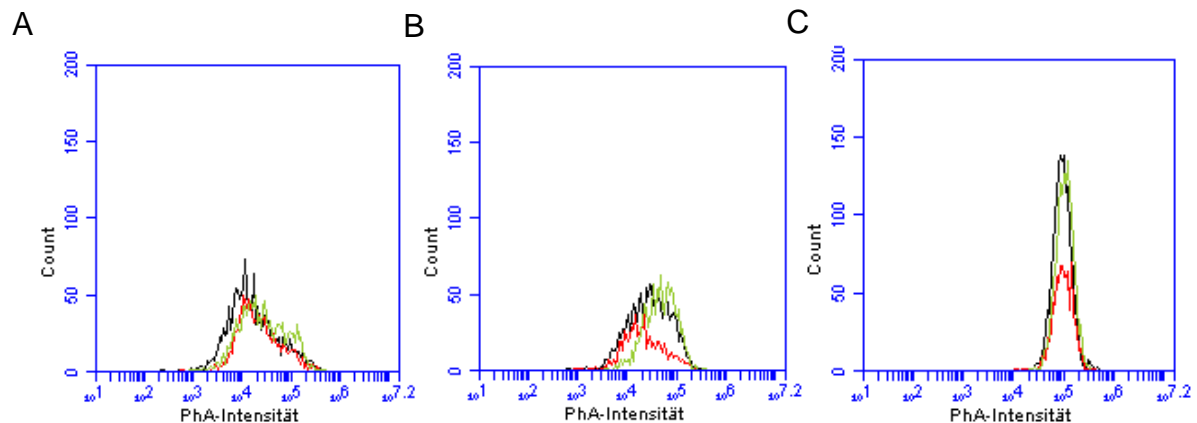
Bei BCRP R482G hingegen zeigte Telmisartan keine konzentrationsabhängige Inhibition. Der inhibitorische Effekt von Telmisartan an der R482G-Mutante war im Vergleich zu BCRP-Wildtyp deutlich abgeschwächt bzw. nicht mehr vorhanden (Abbildung 34).

Eine Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ), bei der eine halbmaximale Inhibition erfolgt, war aufgrund der fehlenden Plateaubildung in der maximalen Effektgröße nicht möglich. Dieses Plateau wird häufig im gewählten experimentellen Ansatz wegen begrenzter Löslichkeit oder toxischer Effekte der Substanzen nicht erreicht (Weiss, 2005).

Um dieses Problem zu umgehen und den Einfluss der BCRP-Mutationen auf die Interaktion von Telmisartan mit dem ABC-Transporter zu visualisieren, wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, in dem der Einfluss einer Referenzkonzentration von



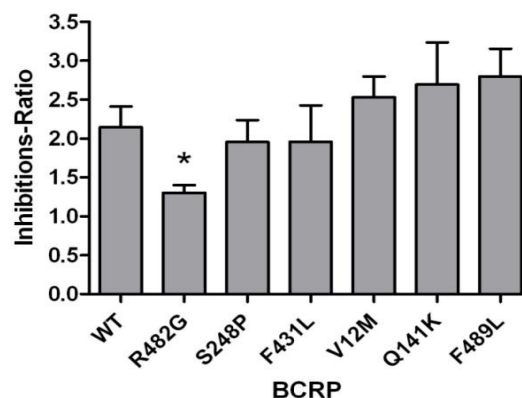
30  $\mu\text{M}$  Telmisartan auf alle BCRP-Mutanten simultan untersucht wurde. In diesem experimentellem Format zeigte sich erneut, dass die R482G-Mutante keinen Einfluss auf die PhA-Intensität hatte, während die F489L-Mutante die PhA-Akkumulation signifikant erhöhte (Abbildung 35 B). Im Gegensatz dazu wurde die PhA-Intensität von FTC (10  $\mu\text{M}$ ) durch die R482G-Mutante bzw. durch die F489L-Mutante nicht verändert (Abbildung 35 A und C).



**Abbildung 35: Untersuchung des Einflusses von 30  $\mu\text{M}$  Telmisartan und 10  $\mu\text{M}$  FTC auf die PhA-Akkumulation in mit BCRP-Wildtyp (schwarz), BCRP R482G (rot) und BCRP F489L (grün) transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen**

Logarithmische Darstellung der PhA-Intensität in mit pTRE-Tight-BI-AcGFP1-BCRP-Wildtyp bzw. BCRP-Mutanten transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen in Abwesenheit (A) eines Inhibitors bzw. in Anwesenheit von 30  $\mu\text{M}$  Telmisartan (B) bzw. 10  $\mu\text{M}$  FTC (C).

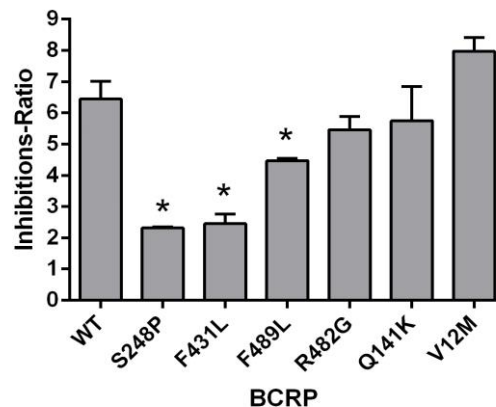
Bei der BCRP-Mutante R482G war der inhibitorische Effekt von Telmisartan im Vergleich zum BCRP-Wildtyp vermindert (Abbildung 36). Bei den anderen BCRP-Mutanten war der inhibitorische Effekt von Telmisartan vergleichbar mit BCRP-Wildtyp.



**Abbildung 36: Untersuchung des inhibitorischen Effekts von 30  $\mu\text{M}$  Telmisartan auf BCRP-Wildtyp und BCRP-Mutanten**

Darstellung der Inhibitions-Ratio in mit BCRP-Wildtyp und den jeweiligen BCRP-Mutanten transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen ( $n=3$ ),  $p < 0,05$  BCRP-Wildtyp vs. BCRP R482G.

Die BCRP-Mutanten F431L, S248P und F489L verringern die inhibitorische Wirkung des potenten BCRP-Inhibitors FTC im Vergleich zum BCRP-Wildtyp (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Untersuchung des inhibitorischen Effekts von 10  $\mu$ M FTC auf BCRP-Wildtyp und BCRP-Mutanten**

Darstellung der Inhibitions-Ratio in mit BCRP-Wildtyp und den jeweiligen BCRP-Mutanten transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen (n=3),  $p < 0,05$  BCRP-Wildtyp vs. BCRP F431L, F489L bzw. S248P.

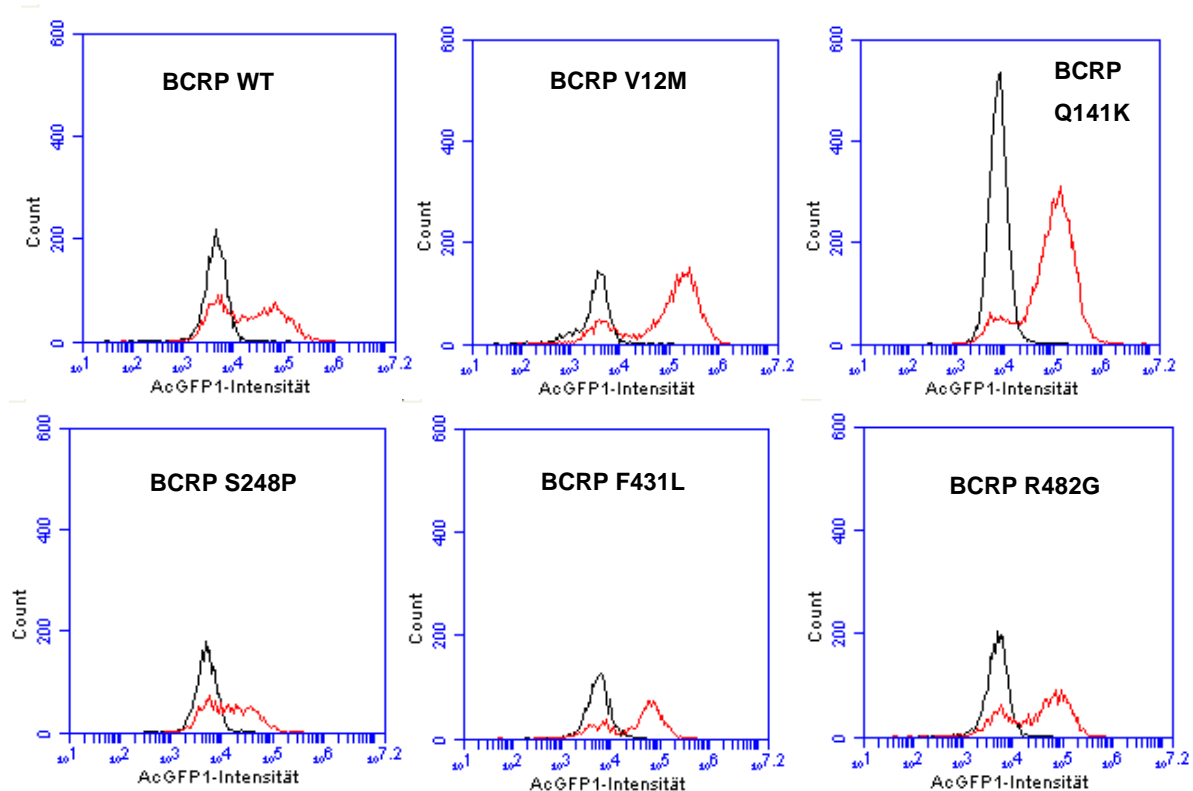
## 4.5 Funktionelle Charakterisierung von BCRP-Mutanten in stabil transfizierten HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen

### 4.5.1 Herstellung stabil transfizierter HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen oder -BCRP-Mutanten-Zellen

Die Herstellung stabil transfizierter HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen oder -BCRP-Mutanten-Zellen erfolgte analog zur Herstellung der stabilen Tet-Off-Zelllinie (siehe 4.1.2). Die HEK293-Tet-On-Zellen wurden mit dem Responderkonstrukt pTRE-Tight-BI-AcGFP1-BCRP und einem linearisierten Hygromycin-Resistenzmarker transfiziert. Das Responderkonstrukt enthielt entweder die BCRP-Wildtyp-Sequenz oder die jeweilige BCRP-Mutante sowie das Reportergen AcGFP1 unter der Kontrolle des TRE-Promoters. Um die induzierbare Expression von BCRP nach Selektionierung zu untersuchen, wurden Klone mit in Kultur gehalten und einmal in An- bzw. Abwesenheit von Doxzyklin (1  $\mu$ g/ml) für weitere 24 h inkubiert. Dann wurde durchflusszytometrisch untersucht, ob die mit Doxzyklin-induzierten Zellen das Reportergen AcGFP1 exprimierten (Hinweis auf simultane BCRP-Expression). Abbildung 38 zeigt die Klone der stabil transfizierten BCRP-Mutanten mit der höchsten induzierbaren AcGFP1-Expression. Der Anteil AcGFP1-positiver Zellen nach Induktion betrug bei den untersuchten Zellklonen:

- BCRP-Wildtyp: 52 %

- V12M-Mutante: 83 %
- Q141K-Mutante: 85 %
- S248P-Mutante: 46 %
- F431L-Mutante: 65 %
- R482G-Mutante: 67 %



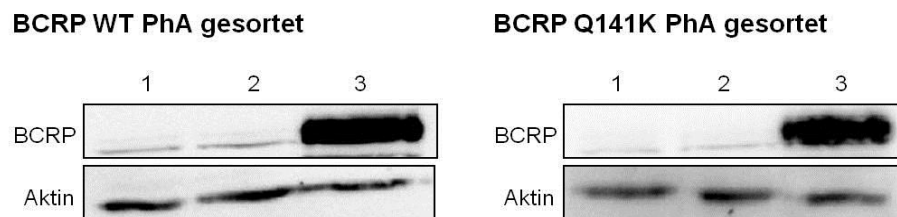
**Abbildung 38: Durchflusszytometrische Analyse der GFP-Induzierbarkeit stabil transfizierter HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen im Durchflusszytometer**

Induktion der stabil transfizierten Zellklone mit 1 µg/ml Doxycyclin (rot) führt zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils AcGFP1-positiver Zellen.

Aufgrund des erheblich unterschiedlichen Anteils an Zellen pro Zellklon mit induzierbarer AcGFP1/BCRP-Expression (46 bis 85 %), wurden die Zellklone in Kooperation mit Herrn Dr. Lothar Gröbe (Abteilung für Experimentelle Immunologie, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig) durchflusszytometrisch *gesortet*. Um die verschiedenen stabilen Zellklone (jeweils induzierbare Expression einer BCRP-Variante) bezüglich der BCRP-Funktionalität untereinander vergleichen zu können, wurde eine ähnliche PhA-Transportkapazität angestrebt. Vor dem Sortiervorgang wurden daher die Zellklone zusätzlich mit PhA beladen und nachfolgend nach AcGFP1-Intensität (*high*) und PhA-Intensität (*low*) von den restlichen Zellen abgetrennt. Diese Zellen wurden nachfolgend erneut kultiviert und bezüglich induzierbarer BCRP-Expression analysiert.

#### 4.5.2 Charakterisierung der Zellklone im Hinblick auf die induzierbare BCRP-Proteinexpression

Mittels Western-Blot-Analyse wurde nach dem *Sorten* überprüft, ob eine Zugabe von 1 µg/ml Doxozyklin zur Induktion der BCRP-Expression führt. Dies bestätigte sich für die Zellklone, welche mit der BCRP-Wildtyp-Sequenz bzw. der Sequenz der Q141K-Mutante stabil transfiziert worden waren (Abbildung 39).



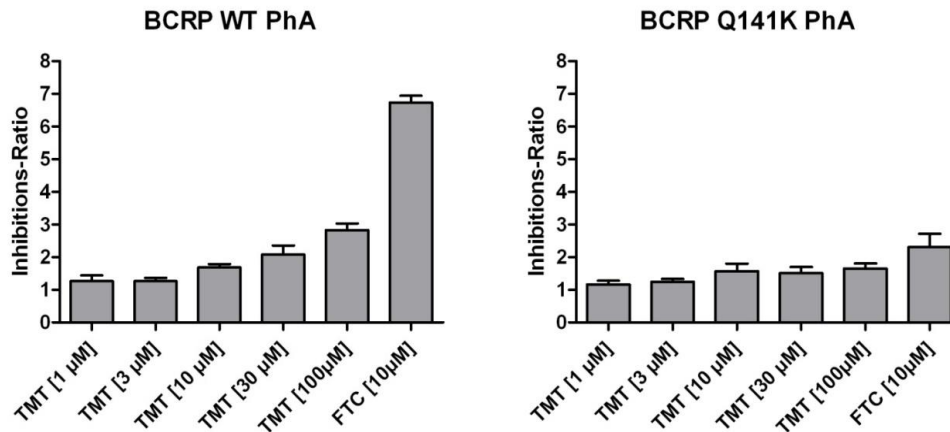
**Abbildung 39: Induktion der BCRP-Expression in sortierten Zellklonen, welche mit der BCRP-Wildtyp-Sequenz bzw. der Sequenz der Q141K-Mutante stabil transfiziert wurden**

Western-Blot-Analyse von BCRP-Wildtyp und der Q141K-Mutante in den Zelllysaten von stabil transfizierten, sortierten HEK293-Tet-On-Zellen mit den spezifischen Antikörpern gegen BCRP bzw. Beta-Aktin; 1: untransfizierte HEK293-Tet-On-Zellen, 2: stabil transfizierte HEK293-Tet-On-Zellen ohne Doxozyklin, 3: stabil transfizierte HEK293-Tet-On-Zellen behandelt mit 1 µg/ml Doxozyklin

Die Zellklone, die mit der Sequenz der F431L- bzw. R482G-Mutante stabil transfiziert wurden, zeigten nach Zugabe von Doxozyklin keine BCRP-Expression. Der Zellklon, der mit der Sequenz der V12M-Mutante stabil transfiziert wurde, wies schon ohne Zugabe von Doxozyklin eine BCRP-Expression auf (beides graphisch nicht dargestellt). Diese drei Zellklone zeigten also keine Induktion der BCRP-Expression nach Zugabe von Doxozyklin und konnten deshalb für weitere Untersuchungen nicht verwendet werden.

#### 4.5.3 Durchflusszytometrische Analyse der Funktion von BCRP-Mutanten nach stabiler Transfektion in HEK293-Tet-On-BCRP-Zellen

Die *gesorteten* Zellklone, die die BCRP-Wildtyp-Sequenz bzw. die Sequenz der Q141K-Mutante enthielten, konnten im durchflusszytometrischen PhA-Efflux-Assay sowohl durch Telmisartan als auch durch FTC inhibiert werden (Abbildung 40). Die Funktionalität der beiden *gesorteten* Zellklone war demzufolge gegeben. Der inhibitorische Effekt von Telmisartan und FTC war bei der Q141K-Mutante aber sehr gering bzw. kaum vorhanden. Im Vergleich mit HEK293-Tet-On-Zellen, die transient mit der BCRP-Wildtyp-Sequenz bzw. mit der Sequenz der Q141K-Mutante transfiziert wurden, fiel die konzentrationsabhängige inhibitorische Wirkung von Telmisartan bei den beiden *gesorteten* Zellklonen insgesamt geringer aus.



**Abbildung 40: Untersuchung des inhibitorischen Effekts von Telmisartan und FTC auf gesortete HEK293-Tet-On-BCRP-Wildtyp-Zellen und HEK293-Tet-On-BCRP Q141K-Zellen**  
Darstellung der Inhibitions-Ratio in mit BCRP-Wildtyp und BCRP Q141K stabil transfizierten, PhA gesorteten HEK293-Tet-On-Zellen (n=3).

#### 4.6 Einfluss von Serumalbumin auf die inhibitorische Interaktion von Telmisartan mit BCRP

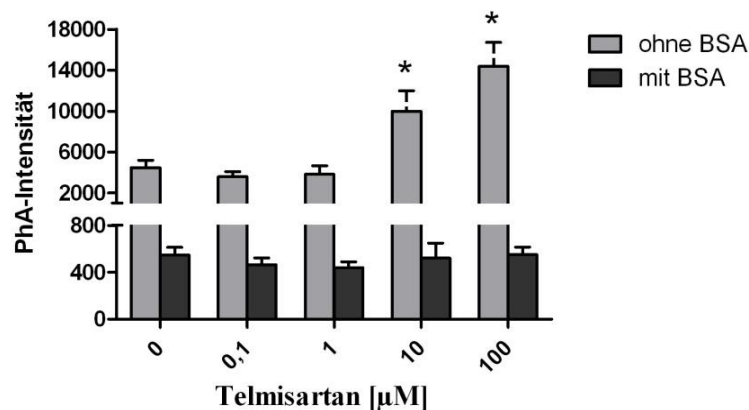
Telmisartan ist zu über 99,5 % an Plasmaproteine, hauptsächlich Serumalbumine, gebunden. Eine derartige Bindung von Telmisartan an Plasmaproteine kann zu einer Verminderung der inhibitorischen Wirkung von Telmisartan auf BCRP führen. Daher wurde die inhibitorische Wirkung für diesen Fall untersucht. Dazu wurden bovines Serumalbumin (BSA) und humanes Serumalbumin (HSA) eingesetzt. Da physiologische Albumin-Konzentrationen im Blut zwischen 35 und 50 g/l liegen, wurden für die Versuche 40 g/l BSA bzw. HSA verwendet.

##### 4.6.1 Bovines Serumalbumin (BSA)

PhA-Efflux-Assays mit Telmisartan bzw. Telmisartan + BSA wurden in MDCKII-par-Zellen und MDCKII-BCRP-Zellen in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen BSA durchgeführt. Die MDCKII-par-Zelllinie, die den ABC-Transporter BCRP nicht exprimiert, diente als Negativkontrolle.

Anhand der Zunahme der PhA-Intensität bei steigender Telmisartan-Konzentration ohne BSA-Zusatz zeigt sich, dass Telmisartan einen inhibitorischen Effekt auf BCRP ausübt (Abbildung 41). Nach Zugabe von BSA hingegen war kein Anstieg der PhA-Intensität zu verzeichnen, so dass BSA anscheinend den inhibitorischen Effekt von Telmisartan auf die Funktion von BCRP aufhebt (Abbildung 41). Bereits ohne jegliche

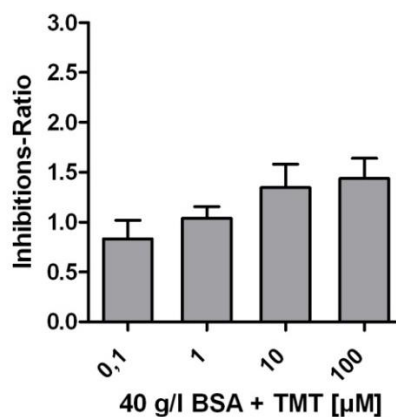
Zugabe von Telmisartan wurde eine Absenkung der PhA-Intensität beobachtet, da BSA PhA vermutlich bindet und ein Eindringen in die Zellen verhindert.



**Abbildung 41: Untersuchung des Einflusses von Telmisartan und Telmisartan + BSA auf die PhA-Intensität in MDCKII-par- und MDCKII-BCRP-Zellen**

Darstellung der PhA-Intensität in MDCKII-par-Zellen und MDCKII-BCRP-Zellen (n=5),  $p < 0,05$  ohne BSA und ohne Telmisartan vs. ohne BSA + 10 μM Telmisartan und ohne BSA + 100 μM Telmisartan.

Die Reduktion der inhibitorischen Wirkung von Telmisartan auf die Funktion von BCRP nach Zugabe von BSA wird ebenfalls anhand der deutlich abgeschwächten Inhibitions-Ratio deutlich (Abbildung 42).



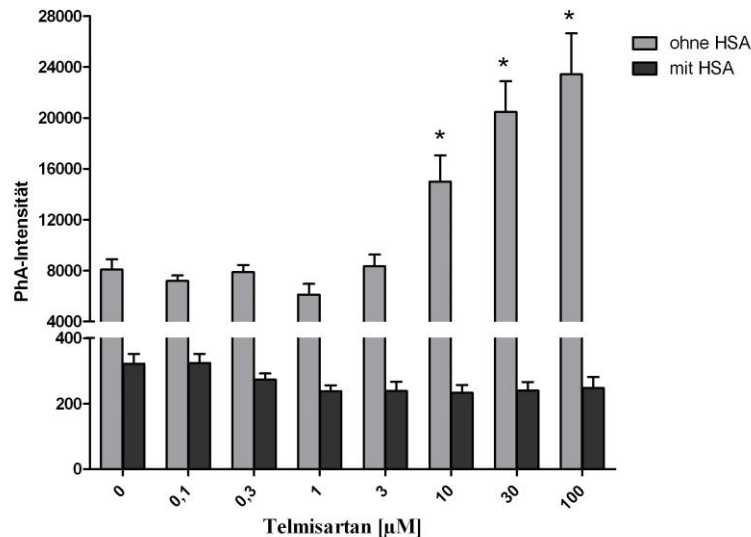
**Abbildung 42: Untersuchung des inhibitorischen Effektes von BSA + Telmisartan (bei steigender Konzentration) auf die Funktion des BCRP in MDCKII-Zellen**

Darstellung der Inhibitions-Ratio errechnet aus Werten erhalten in MDCKII-par-Zellen und MDCKII-BCRP-Zellen (n=5).

#### 4.6.2 Humanes Serumalbumin (HSA)

Analog zu BSA wurden PhA-Efflux-Assays mit Telmisartan bzw. Telmisartan + HSA in MDCKII-par-Zellen und MDCKII-BCRP-Zellen durchgeführt. Ohne Zusatz von HSA übte Telmisartan eine inhibitorische Wirkung auf BCRP aus, was sich in einer Zunahme der PhA-Intensität zeigte (Abbildung 43). Nach Zugabe von HSA war

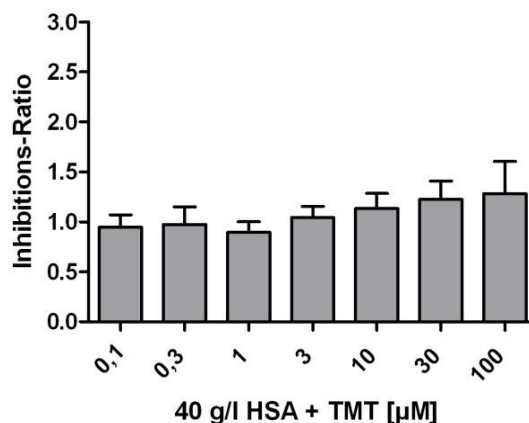
wiederum kein Anstieg der PhA-Intensität zu verzeichnen (Abbildung 43). Im Vergleich zu BSA war die PhA-Intensität nach Zugabe von HSA auch niedriger als nach BSA-Zugabe. Dies deutet auf eine vergleichsweise stärkere Bindung von Telmisartan an HSA hin.



**Abbildung 43: Untersuchung des Einflusses von Telmisartan und Telmisartan + HSA auf die PhA-Intensität in MDCKII-par- und MDCKII-BCRP-Zellen**

Darstellung der PhA-Intensität in MDCKII-par-Zellen und MDCKII-BCRP-Zellen (n=4),  $p < 0,05$  ohne HSA + ohne Telmisartan vs. ohne HSA + 10 µM Telmisartan, ohne HSA + 30 µM Telmisartan bzw. ohne HSA + 100 µM Telmisartan.

Analog der Versuche mit BSA wurde die Inhibitions-Ratio nach HSA-Zugabe ermittelt. Aus den dargestellten Daten wird ersichtlich, dass HSA die Telmisartan-vermittelte Hemmung der BCRP-Funktion aufhebt (Abbildung 44).

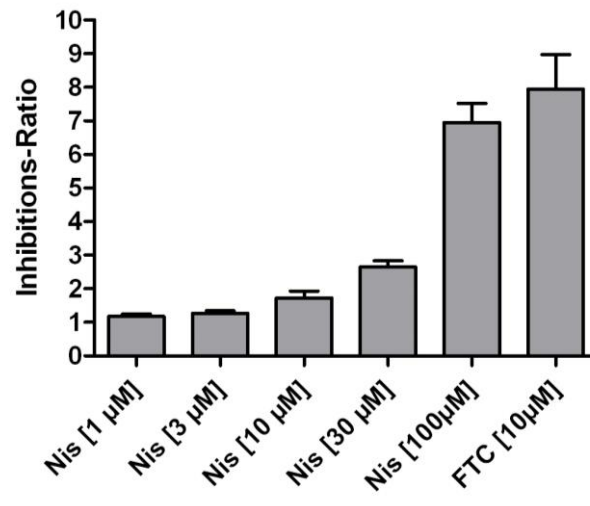


**Abbildung 44: Untersuchung des inhibitorischen Effektes von HSA + Telmisartan (bei steigender Konzentration) auf die Funktion des BCRP in MDCKII-Zellen**

Darstellung der Inhibitions-Ratio errechnet aus Werten erhalten in MDCKII-par-Zellen und MDCKII-BCRP-Zellen (n=4).

#### 4.7 Analyse des Effekts von Nisoldipin auf die Funktion von BCRP

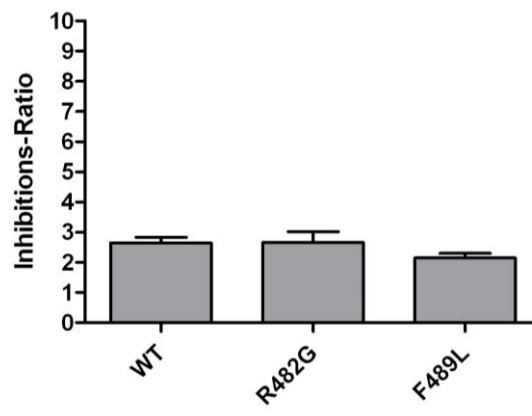
Der Einfluss von Nisoldipin auf die Funktion von BCRP wurde mit Hilfe des PhA-Efflux-Assays analysiert. Nisoldipin führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der BCRP-Funktion (Abbildung 45).



**Abbildung 45: Untersuchung des Effekts von Nisoldipin auf die Funktion des BCRP-Wildtyp**

Darstellung der Inhibitions-Ratio in mit BCRP-Wildtyp transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen (n=3).

Da unsere Untersuchungen mit Telmisartan Hinweise lieferten, dass die Mutanten R482G bzw. F489L mit einer veränderten Substratinteraktion einhergehen können, wurde die Wirkung von Nisoldipin auf diese beiden BCRP-Mutanten überprüft. Dazu wurde eine Nisoldipin-Konzentration von 30 µM ausgewählt, da bei dieser Konzentration eine deutliche Hemmung des BCRP-Wildtyps auftrat. Die R482G- und F489L-Mutationen schwächten die inhibitorische Wirkung von Nisoldipin am BCRP jedoch nicht signifikant ab (Abbildung 46).



**Abbildung 46: Untersuchung des inhibitorischen Effekts von 30 µM Nisoldipin auf den BCRP-Wildtyp und die BCRP-Mutanten R482G und F489L**

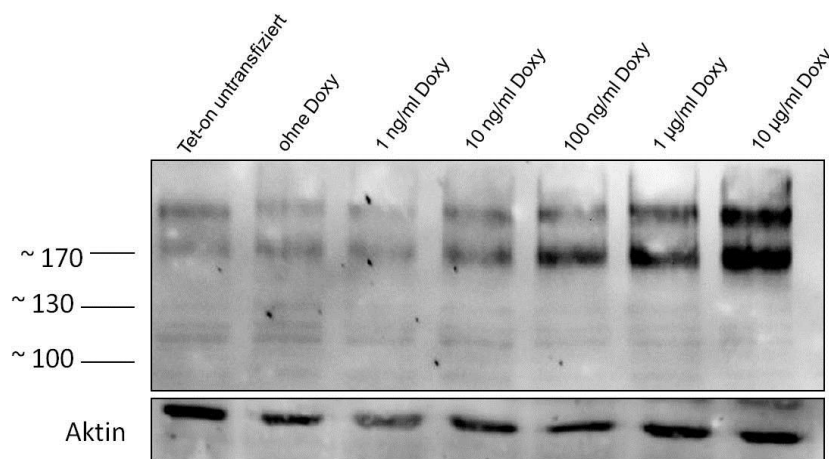
Darstellung der Inhibitions-Ratio in mit BCRP-Wildtyp und den jeweiligen BCRP-Mutanten transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen (n=3).



## 4.8 Validierung des Tet-On-P-gp-Systems

### 4.8.1 Doxyzyklin-regulierbare Expression von P-gp in HEK293-Tet-On-Zellen

Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Induzierbarkeit des Tet-on-P-gp-Systems in transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von Doxyzyklin untersucht. Eine Doxyzyklin-abhängige Expression von P-gp auf Proteinebene konnte mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden (Bande bei ca. 170 kDa) (Abbildung 47).



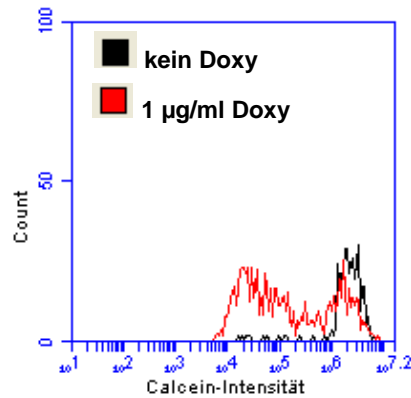
**Abbildung 47: Doxyzyklin-abhängige Proteinexpression von P-gp-Wildtyp in HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen**

Western-Blot-Analyse von P-gp in den Zelllysaten von transient transfizierten HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen mit den spezifischen Antikörpern gegen P-gp und Beta-Aktin. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot mit der Proteinexpression von P-gp-Wildtyp nach Zugabe aufsteigender Doxyzyklin-Konzentrationen für 24 h.

Mit steigender Doxyzyklin-Konzentration nahm die P-gp-Expression zu, wobei ein Maximum bei 10 µg/ml Doxyzyklin erreicht wurde. Für weitere Versuche wurden, wie bei BCRP, 1 µg/ml Doxyzyklin verwendet, weil damit das Tet-On-System ausreichend aktiviert wurde.

### 4.8.2 Durchflusszytometrische Analyse der P-gp-Funktionalität

Beim Calcein-AM-Assay pumpt funktionelles P-gp Calcein-AM aus der Zelle heraus. Somit wird verhindert, dass Calcein-AM durch Esterasen in Calcein gespalten wird, sich Calcein in den Zellen anreichert und die Calcein-Intensität ansteigt. In nicht-induzierten HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen lag die höchste Calcein-Intensität vor. Bei induzierten Zellen war eine deutliche Abnahme der Calcein-Intensität als Ausdruck zunehmender P-gp-Funktionalität festzustellen (Abbildung 48).



**Abbildung 48: Durchflusszytometrische Analyse der P-gp-Expression in HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen**

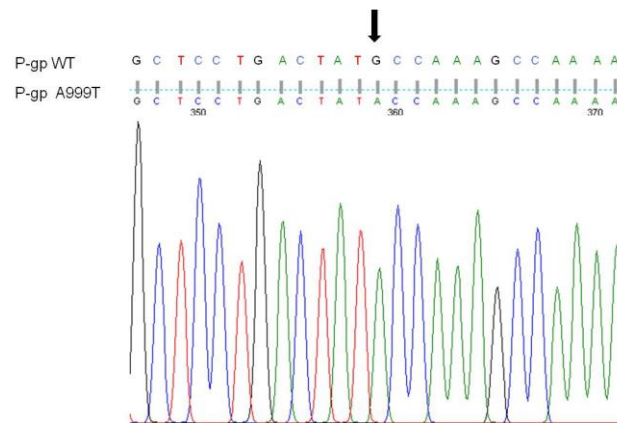
Durchflusszytometrischer Calcein-AM-Assay in transient transfizierten HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen ohne Doxyzyklinzugabe (schwarz) und nach Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin (rot) (n=2). Zugabe von 1 µg/ml Doxyzyklin führt zur Abnahme der Calcein-Intensität als Ausdruck der Aktivierung der P-gp-Expression durch Doxyzyklin.

## 4.9 Charakterisierung von P-gp-Mutanten nach transienter Transfektion in HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen

### 4.9.1 Generierung klinisch relevanter P-gp-Mutanten

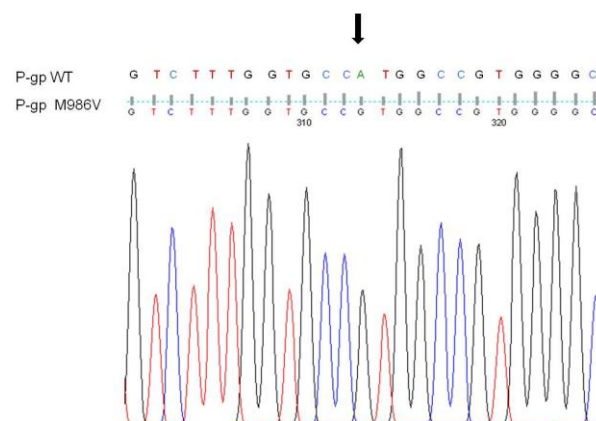
Wie bei BCRP wurden die P-gp-Mutanten A999T, M986V, A893S, I1145I, S400N und der Haplotyp I1145I + A893S unter Verwendung der jeweiligen Primer (siehe 3.1.8) mit Hilfe des Mutagenese-Reagenziensystems „QuikChange® Lightning *Site-Directed-Mutagenesis*“ hergestellt. Anschließend wurden die Mutanten sequenziert, um den Erfolg der Mutagenese nachzuweisen.

Im Falle der P-gp-Mutante A999T zeigten die Sequenzierungsergebnisse, dass Alanin (Basenfolge GCC) zu Threonin (Basenfolge ACC) mutiert wurde (Abbildung 49), indem die Nukleinbase G gegen A ausgetauscht wurde.



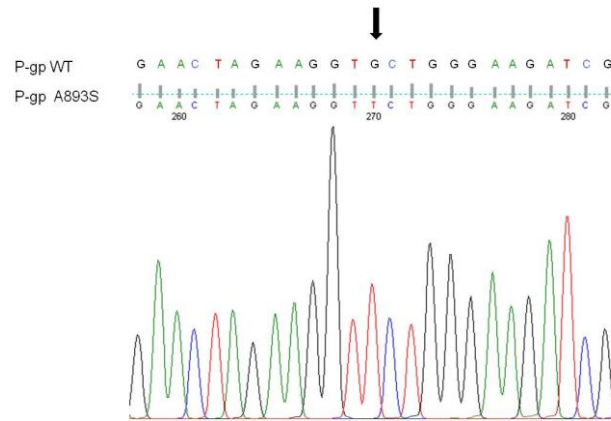
**Abbildung 49:** Oben Nukleotidsequenz des P-gp-Wildtyps, darunter Nukleotidsequenz der P-gp-Mutante A999T und dazugehöriges Chromatogramm nach erfolgreicher Mutagenese. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung.

Bei der Mutante M986V bestätigte das Chromatogramm der Sequenzierung den erfolgreichen Tausch von ATG (kodierend für Methionin) zu GTG (kodierend für Valin) (Abbildung 50). Die Nukleinbase A aus ATG wurde gegen die Nukleinbase G ausgetauscht.



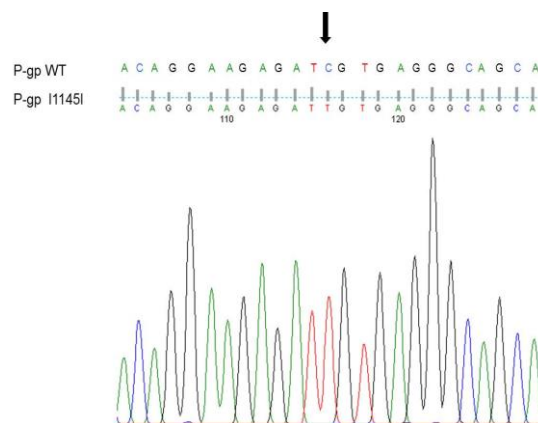
**Abbildung 50:** Oben Nukleotidsequenz des P-gp-Wildtyps, darunter Nukleotidsequenz der P-gp-Mutante M986V und dazugehöriges Chromatogramm nach erfolgreicher Mutagenese. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung.

Beim Konstrukt P-gp A893S war anhand der Sequenzierungsergebnisse zu erkennen, dass Alanin (Basenfolge GCT) zu Serin (Basenfolge TCT) mutiert wurde (Abbildung 51). Dazu wurde in der Basenfolge GCT die Nukleinbase G gegen die Nukleinbase T getauscht.



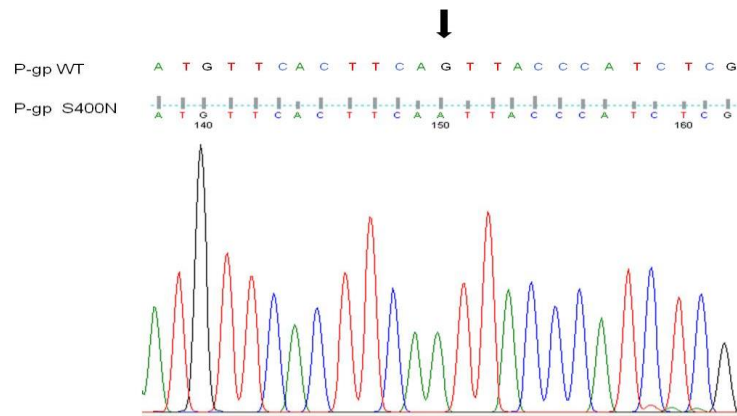
**Abbildung 51:** Oben Nukleotidsequenz des P-gp-Wildtyps, darunter Nukleotidsequenz der P-gp-Mutante A893S und dazugehöriges Chromatogramm. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung.

Das Sequenzierungsergebnis der P-gp-Mutante I1145I zeigte, dass die Basenfolge ATC (kodierend für Isoleucin) zu ATT (auch wieder kodierend für Isoleucin) geändert wurde (Abbildung 52). Dazu fand ein Austausch der Nukleinbase C gegen die Nukleinbase T statt.



**Abbildung 52:** Oben Nukleotidsequenz des P-gp-Wildtyps, darunter Nukleotidsequenz der P-gp-Mutante I1145I und dazugehöriges Chromatogramm nach erfolgreicher Mutagenese. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung.

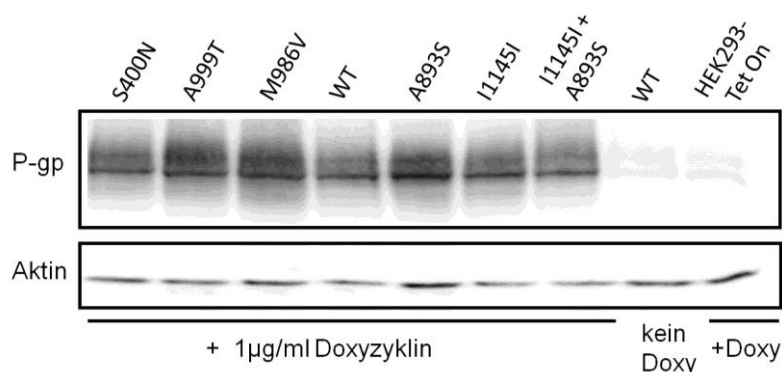
Bei der Mutante S400N bestätigte das Chromatogramm der Sequenzierung, dass Serin (Basenfolge AGT) zu Asparagin (Basenfolge AAT) mutiert wurde (Abbildung 53), indem die Nukleinbase G in der Basenfolge AGT gegen die Nukleinbase A ausgetauscht wurde.



**Abbildung 53:** Oben Nukleotidsequenz des P-gp-Wildtyps, darunter Nukleotidsequenz der P-gp-Mutante S400N und dazugehöriges Chromatogramm nach erfolgreicher Mutagenese. Dargestellt ist das Ergebnis der Sequenzierung.

#### 4.9.2 Analyse des Expressionsniveaus der generierten P-gp-Mutanten nach Expression in HEK293-Tet-On-Zellen

Um den Einfluss der veränderten P-gp-Aminosäure-Sequenz auf die Proteinexpression der verschiedenen Mutanten zu untersuchen, wurde die P-gp-Expression der Membranfraktionen von P-gp-Wildtyp und den verschiedenen P-gp-Mutanten in transient transfizierten HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen in der Western-Blot-Analyse verglichen. Die Expression von P-gp-Wildtyp war vergleichbar mit der der P-gp-Mutanten. Zudem konnte auch bei nicht-induzierten P-gp-Wildtyp-Zellen sowie bei der Negativkontrolle eine geringfügige P-gp-Expression beobachtet werden (Abbildung 54).

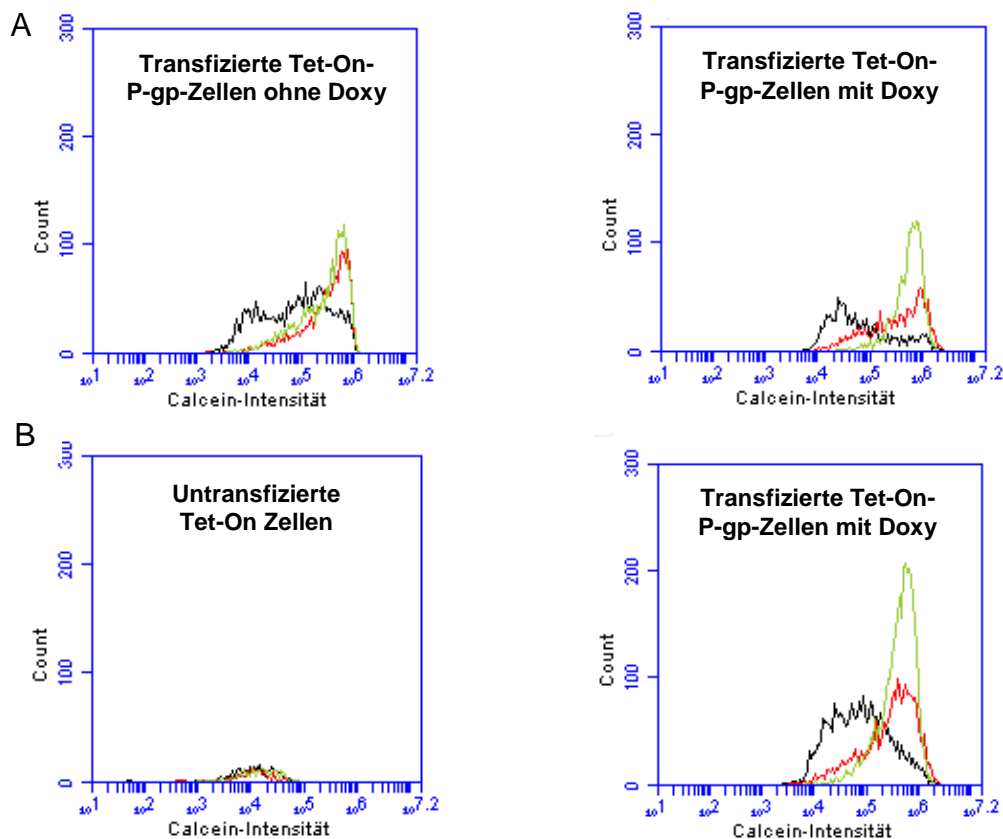


**Abbildung 54:** Expressionsniveau von P-gp-Wildtyp und P-gp-Mutanten in HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen

Western-Blot-Analyse von P-gp-Wildtyp und P-gp-Mutanten in den Membranfraktionen von transient transfizierten HEK293-Tet-On-P-gp-Wildtyp-Zellen und HEK293-Tet-On-P-gp-Mutanten-Zellen, die mit 1 µg/ml Doxyzyklin für 24 h behandelt wurden. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot.

#### 4.9.3 Durchflusszytometrische Analyse der Funktion von P-gp-Mutanten und ihrer Interaktion mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Telmisartan

Mit dem Calcein-AM-Assay wurde untersucht, ob die generierten Mutationen von P-gp die inhibitorische Wirkung von Telmisartan auf den ABC-Transporter beeinflussen. Als pharmakologischer Referenzinhibitor für P-gp wurde Verapamil verwendet. In nicht-induzierten HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen, welche kein P-gp exprimieren sollten, hatten Telmisartan und Verapamil bereits einen Einfluss auf die Calcein-Intensität gezeigt. Beide erhöhten die Calcein-Intensität (Abbildung 55 A). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass anscheinend schon ohne Zugabe von Doxyzyklin P-gp durch den besagten Zelltyp exprimiert wurde. Die nicht-induzierten HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen stellten somit keine geeignete Negativkontrolle für den Calcein-AM-Efflux-Assay dar.

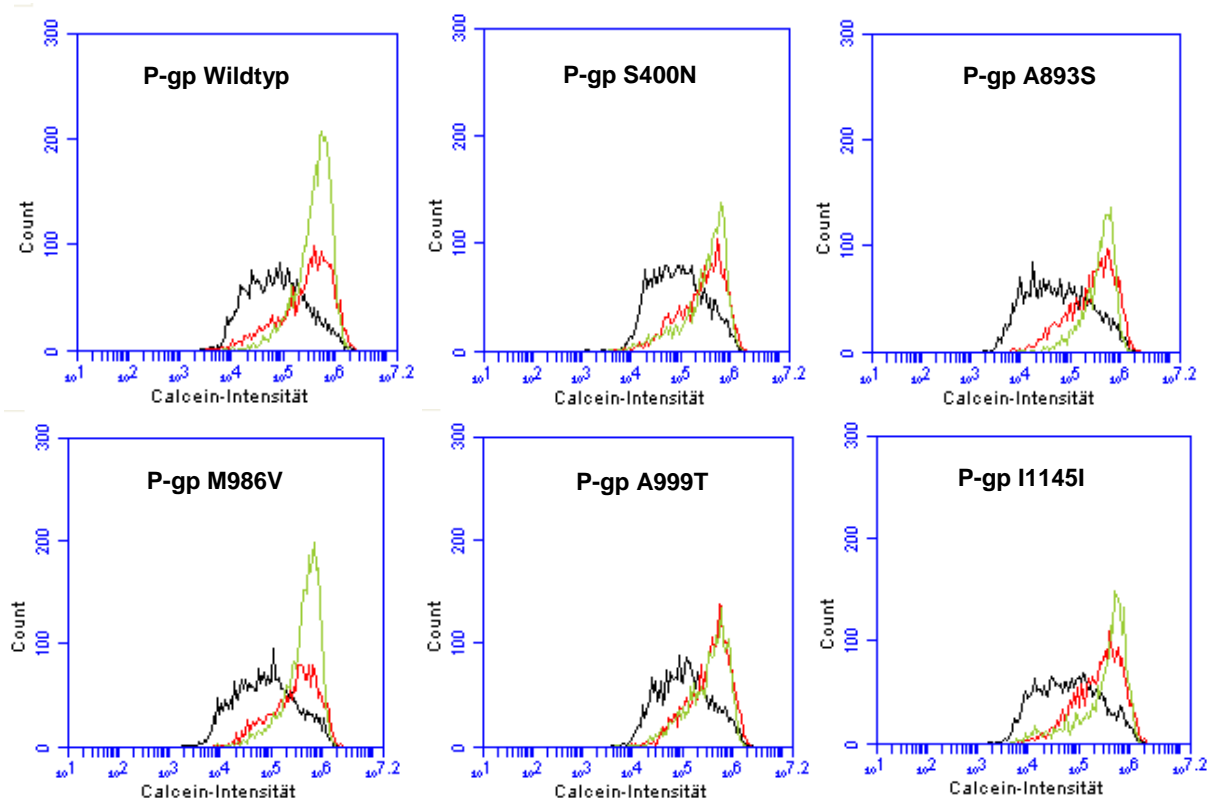


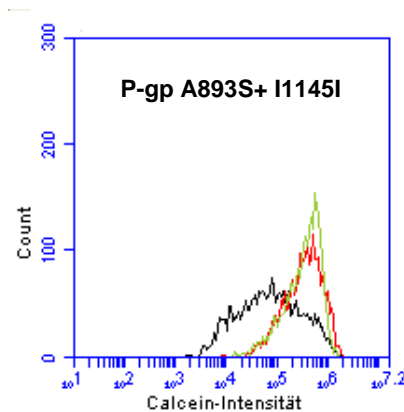
**Abbildung 55: Untersuchung des Einflusses von Telmisartan und Verapamil auf die Calcein-Akkumulation in HEK293-Tet-On-Zellen**

Logarithmische Darstellung der Calcein-Intensität in mit mit pTRE-Tight-BI-tdTomato-P-gp transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen ohne Doxyzyklin (A) und mit Doxyzyklin (B) inkubiert mit 0,08  $\mu$ M Calcein-AM in Abwesenheit eines Inhibitors (schwarz) und in Anwesenheit von 100  $\mu$ M Telmisartan (rot) bzw. 100  $\mu$ M Verapamil (grün).

Daher wurden als Negativkontrolle untransfizierte HEK293-Tet-On-Zellen ausgewählt. So konnte ein Einfluss von Telmisartan und Verapamil auf die Calcein-

Akkumulation in diesem Zelltyp im Rahmen des Calcein-AM-Efflux-Assays ausgeschlossen werden (Abbildung 55 B). In induzierten HEK293-Tet-On-P-gp-Zellen dagegen erhöhten beide Substanzen im Sinne einer Hemmung der P-gp-Funktion die Calcein-Intensität. Für nachfolgende Vorversuche wurde eine Telmisartan-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ausgewählt, die im Rahmen früherer Untersuchungen der Arbeitsgruppe maximale Hemmeffekte am untersuchten ABC-Transporter induziert hatte. 100  $\mu\text{M}$  Telmisartan und 100  $\mu\text{M}$  Verapamil erhöhten bei allen P-gp-Mutanten die Calcein-Intensität in einem ähnlichen Ausmaß (Abbildung 56). Somit scheinen die generierten Mutationen bei der gewählten Konzentration in diesen präliminären Analysen keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Interaktion des ABC-Transporters mit Telmisartan oder Verapamil zu haben. Diese Ergebnisse müssen in weiterführenden Untersuchungen, welche außerhalb des Rahmens dieser Arbeit liegen, verifiziert und durch Konzentrations-Effekt-Untersuchungen ergänzt werden.



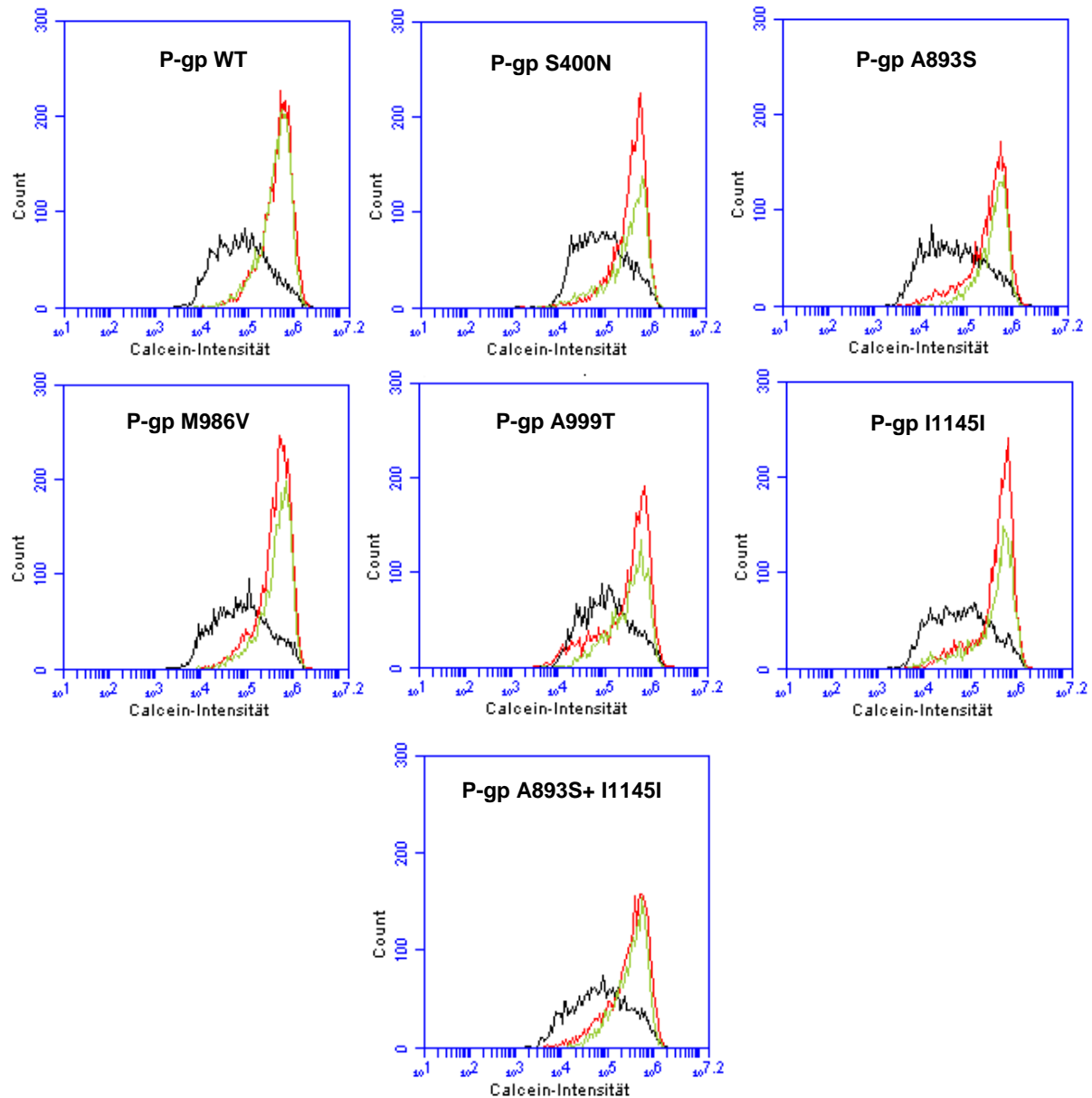


**Abbildung 56: Überlagerte Durchflusszytometrie-Histogramme der Calcein-Intensität von P-gp-Wildtyp und P-gp-Mutanten nach Zugabe von 100 µM Telmisartan und 100 µM Verapamil**  
 Logarithmische Darstellung der Calcein-Intensität in mit P-gp-Wildtyp und den jeweiligen P-gp-Mutanten transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen in Abwesenheit eines Inhibitors (schwarz) und in Anwesenheit von 100 µM Telmisartan (rot) bzw. 100 µM Verapamil (grün) (n=2).

#### 4.10 Analyse des potentiell inhibitorischen Effekts von Nisoldipin auf die Funktion von P-gp

Der Einfluss von Nisoldipin auf die Funktion des P-gp-Wildtyps bzw. der P-gp-Mutanten wurde mit Hilfe des Calcein-AM-Assays analysiert. Analog der unter 4.9.3 durchgeführten Analysen wurden untransfizierte HEK293-Tet-On-Zellen als Negativkontrolle eingesetzt. Als Referenzinhibitor für P-gp wurde erneut Verapamil verwendet. Aus Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass Nisoldipin inhibitorische Effekte am P-gp entfalten kann, wobei maximal inhibitorische Effekte bei ca. 100 µM erreicht wurden. Daher wurde für die Versuche eine Konzentration von 100 µM Nisoldipin verwendet. 100 µM Nisoldipin und 100 µM Verapamil erhöhten beim P-gp-Wildtyp und allen P-gp-Mutanten die Calcein-Intensität in einem ähnlichen Ausmaß (Abbildung 57). Somit scheinen die generierten Mutationen bei der gewählten Konzentration in diesen präliminären Versuchen keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Interaktion des ABC-Transporters mit Nisoldipin zu haben. Diese Ergebnisse müssen allerdings ebenfalls in weiterführenden Untersuchungen, welche außerhalb des Rahmens dieser Arbeit liegen, verifiziert und durch Konzentrations-Effekt-Untersuchungen ergänzt werden.





**Abbildung 57: Überlagerte Durchflusszytometrie-Histogramme der Calcein-Intensität von P-gp-Wildtyp und P-gp-Mutanten nach Zugabe von 100 µM Nisoldipin und 100 µM Verapamil**  
 Logarithmische Darstellung der Calcein-Intensität in mit P-gp-Wildtyp bzw. den jeweiligen P-gp-Mutanten transient transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen in Abwesenheit eines Inhibitors (schwarz) und in Anwesenheit von 100 µM Nisoldipin (rot) bzw. 100 µM Verapamil (grün).

## 5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Interaktion von Telmisartan mit dem ABC-Transporter BCRP durch genetische Varianten des Proteins verändert werden kann. So konnten wir beobachten, dass der inhibitorische Effekt von Telmisartan auf die Funktion des BCRP durch die R482G-Mutante fast vollständig aufgehoben wurde und auch durch hohe Konzentrationen des Telmisartans nicht wiederhergestellt werden konnte. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir jedoch zeigen, dass die Funktion der R482G-Mutante per se nicht eingeschränkt war. So war die basale Transportkapazität des Referenzsubstrats Pheophorbid A (PhA) bei der R482G-Mutante im Vergleich zum BCRP-Wildtyp nicht eingeschränkt. Zudem wurde der inhibitorische Effekt des Referenzinhibitors Fumitremorgin C (FTC) bzw. des Dihydropyridin-Calciumkanalblockers Nisoldipin auf die BCRP-Funktion durch die R482G-Mutation nicht verändert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Arginin-Rest an Position 482 eine wichtige Rolle für die Interaktion von Telmisartan mit BCRP spielt, aber keinen grundlegenden Einfluss auf die basale Funktion des ABC-Transporters oder die Interaktion von BCRP mit anderen Inhibitoren, wie z. B. FTC, hat. Es ist bekannt, dass Mutationen des BCRP an der Aminosäure 482 die Substratspezifität des ABC-Transporters beeinflussen können und das Spektrum transportierter Substanzen erweitern (z. B. zusätzlicher Transport von Daunorubicin) bzw. die Transportkapazität für bekannte BCRP-Substrate verändern (z. B. verstärkter Transport von Mitoxantron) (Robey et al., 2003). Diese häufig in Tumorzellen beobachteten (somatischen) Mutationen können folglich einen profunden Einfluss auf die klinische Effektivität von Chemotherapeutika ausüben. Für die HIV-Proteaseinhibitoren Ritonavir, Saquinavir und Nelfinavir konnte nachgewiesen werden, dass ihre inhibitorische Potenz am ABC-Transporter BCRP durch die R482G-Mutation verstärkt wird und somit dieser Teil des BCRP-Moleküls von Bedeutung für die Interaktion der Arzneistoffgruppe mit dem ABC-Transporter sein könnte (Gupta et al., 2004). Auch konnte beobachtet werden, dass die inhibitorische Wirkung von Novobiocin, ein in Deutschland nicht als Humanantibiotikum zugelassener Hemmstoff der bakteriellen Gyrase, auf die Funktion des BCRP durch die R482G-Mutation beeinflusst wurde. Novobiocin inhibierte den BCRP-Wildtyp-vermittelten Efflux von BODIPY-Prazosin signifikant, während dieser inhibitorische Effekt in Zellen, welche die R482G-Mutante exprimierten, kaum mehr nachweisbar war (Robey et al., 2003). FTC hingegen inhibierte sowohl den BCRP-Wildtyp- als

auch den BCRP R482G-vermittelten BODIPY-Prazosin-Efflux signifikant, ein Befund, der sich mit unseren Untersuchungen deckt.

In unseren Analysen wiesen die BCRP-Mutanten Q141K, V12M, F431L und S248P keine veränderte Interaktion mit Telmisartan auf. An der BCRP-Mutante F489L zeigte sich jedoch im hohen Konzentrationsbereich (100  $\mu$ M) eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte inhibitorische Effizienz von Telmisartan. Möglicherweise führt daher der Aminosäureaustausch an dieser Position zu einer Veränderung der Proteinstruktur des BCRP, welche eine effizientere Hemmung der Transportfunktion durch Telmisartan ermöglicht. Insgesamt sprechen unsere Befunde somit für eine wichtige Bedeutung der dritten transmembranären  $\alpha$ -Helix des BCRP (und hier insbesondere des Arginins an Position 482) für die Interaktion von Telmisartan mit dem ABC-Transporter. Zukünftige pharmakogenetische Untersuchungen werden zudem zeigen, ob Menschen mit der F489L-Variante des BCRP eine veränderte Pharmakokinetik von Telmisartan aufweisen.

Weiterhin konnten wir im Rahmen dieser Arbeit nachweisen, dass der zelluläre Proteingehalt von BCRP durch verschiedene Mutationen signifikant beeinflusst wurde. Die Proteinexpression der Q141K-Mutante und der F489L-Mutante in HEK293-Tet-On-Zellen war im Vergleich zum BCRP-Wildtyp und den anderen Mutanten deutlich erniedrigt. Hingegen zeigten sich für die besagten BCRP-Mutanten keine Unterschiede hinsichtlich des mRNA-Expressionsniveaus, was dafür spricht, dass die Transkription bzw. die mRNA-Stabilität durch die Mutationen nicht beeinträchtigt werden. Zudem deuten diese Befunde darauf hin, dass mutationsbedingte Unterschiede im BCRP-Proteingehalt durch Reduktion der Translation oder durch Beeinflussung der Proteinstabilität bzw. des Proteinabbaus verursacht werden. Unsere Befunde sind im Einklang mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen: So konnten beispielsweise Tamura et al. nachweisen, dass ausgewählte BCRP-Mutanten (z. B. F489L, F431L und S248P) eine dem BCRP-Wildtyp vergleichbare mRNA-Expression aufwiesen (Tamura et al., 2007b). Eine vergleichbare mRNA-Expression von BCRP-Wildtyp und der Q141K-Mutante wurde auch von Furukawa et al. festgestellt, obwohl die Proteinexpression der Mutante reduziert war (Furukawa et al., 2009). Unsere Befunde zum reduzierten Proteingehalt der Q141K-Mutante in HEK293-Tet-On-Zellen decken sich zudem größtenteils mit

den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So konnte gezeigt werden, dass die Q141K-Mutante in stabil transfizierten murinen PA317-Zellen bzw. in Flp-In-293-Zellen eine im Vergleich zum Wildtyp erniedrigte Proteinexpression aufwies (Imai et al., 2002; Tamura et al., 2007a). Im Gegensatz dazu konnte eine weitere Arbeitsgruppe keine veränderte Proteinexpression für die Q141K-Mutante in HEK293-Zellen feststellen (Morisaki et al., 2005). Die Gründe für die Diskrepanz zwischen diesem Ergebnis und unseren Befunden sind unklar, allerdings kann die Verwendung unterschiedlicher Expressionsvektoren und Zelltypen profunde Auswirkungen auf die Expression von Transgenen haben und so zu unterschiedlichen und zum Teil diskrepanten Ergebnissen führen. Interessanterweise konnten Furukawa et al. in diesem Zusammenhang nachweisen, dass eine Reduktion des Proteingehalts der Q141K-Mutante hauptsächlich durch gesteigerten Proteinabbau über Ubiquitinierung und nachfolgenden verstärkten proteasomalen Abbau vermittelt wird (Furukawa et al., 2009). Somit könnte eine mutationsbedingte veränderte Proteinstruktur zu einem gesteigerten Abbau des BCRP und somit zu einer Reduktion des intrazellulären BCRP-Proteingehalts führen. Zum Einfluss der F489L-Mutation auf die Expression von BCRP ist bislang nur wenig bekannt. Allerdings konnte eine japanische Arbeitsgruppe eine leicht erniedrigte Proteinexpression der F489L-Variante in Sf9-Zellen beobachten (Tamura et al., 2006). Weiterführende Untersuchungen an Probanden oder Patienten, welche die Q141K- bzw. F489L-Varianten des BCRP exprimieren, werden jedoch klären, ob die in vitro beobachteten Phänomene zum Einfluss genetischer Variabilität auf die BCRP-Proteinexpression auch in vivo eine Rolle spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir außerdem zeigen, dass die untersuchten BCRP-Mutationen die prinzipielle Membranständigkeit von BCRP nicht beeinflussen. Alle untersuchten BCRP-Mutanten wiesen eine zellmembranständige Lokalisation auf. Es kann somit vermutet werden, dass die Mutationen zelluläre Mechanismen der Membranintegration von BCRP bzw. den Proteintransport zum Zielkompartiment, hier der Plasmamembran, nicht oder nur geringfügig beeinflussen. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass die oben beschriebene mutationsbedingte Reduktion des zellulären BCRP-Proteingehalts, wie er für die Mutanten Q141K und F489L durch uns nachgewiesen werden konnte, ebenfalls zu einer Reduktion des Anteils zellmembranständiger und somit prinzipiell funktionaler Transporter-Proteine führt.

Eine solche Reduktion konnte allerdings mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analyse nicht sicher nachvollzogen werden. Weiterführende Analysen werden daher klären, ob es mutationsbedingt zu einer Abnahme zellmembranständiger BCRP-Moleküle kommt.

Desweiteren konnten wir feststellen, dass zwar alle untersuchten BCRP-Mutanten das Modellsubstrat PhA transportierten, aber dass die basale Transportkapazität unterschiedlich war. So war die PhA-Transportkapazität der Varianten F489L, F431L und S248P im Vergleich zum Wildtyp zum Teil deutlich erniedrigt. Bei der F489L-Mutante könnte diese reduzierte PhA-Transportkapazität möglicherweise auf eine expressionsbedingte Reduktion funktionaler BCRP-Moleküle an der Zellmembran zurückzuführen sein, da, wie bereits beschrieben, in der Western-Blot-Analyse bei dieser Mutante ein geringerer zellulärer Proteingehalt detektiert wurde. Hingegen war bei den F431L- und S248P-Mutanten die Expression unverändert, so dass in diesem Zusammenhang bislang ungeklärte Mechanismen für die Reduktion der PhA-Transportkapazität verantwortlich gemacht werden müssen. Jonker et al. verdeutlichten die Wichtigkeit von BCRP im Transport von Protoporphyrin und dem Porphyrin PhA in BCRP-*Knockout*-Mäusen (Jonker et al., 2002). Diese Mäuse waren sensibler gegenüber PhA, welches zyto- und phototoxische Eigenschaften aufweist, als Mäuse mit intakter BCRP-Expression. Sie entwickelten eine phototoxische Reaktion nach exogener Applikation von PhA. PhA ist ein Abbauprodukt von Chlorophyll. Herbivora und Omnivora nehmen Chlorophyll mit der Nahrung auf. Bei Menschen wurde von einer PhA-induzierten Phototoxizität nach Einnahme von Chlorella-Tabletten zur Nahrungsergänzung berichtet (Jitsukawa et al., 1984). Diese Tabletten enthalten Süßwasseralgen, die reich an Chlorophyll sind. Die PhA-induzierte Phototoxizität kann also durch eine reduzierte oder fehlende BCRP-Aktivität auftreten, welche sich möglicherweise auch als Folge von Mutationen, wie den von uns beschriebenen, zeigen kann. Deshalb können unsere Beobachtungen zum Einfluss von BCRP-Mutationen auf die PhA-Transportkapazität nicht nur von wissenschaftlicher, sondern auch von klinischer Bedeutung sein. Im Einklang mit unseren Befunden konnten Tamura et al. nachweisen, dass die BCRP-Mutante F489L-Mutante einen nur eingeschränkten Transport von Hematoporphyrin erlaubt (Tamura et al., 2006). Insgesamt konnten wir somit nachweisen, dass die Mutationen S248P, F431L und F489L des ABC-Transporters BCRP mit einer zum Teil

drastischen und bis dato mechanistisch unklaren Reduktion der PhA-Transportkapazität einhergehen.

Um in einem ähnlichen Ansatz den Einfluss genetischer Variabilität auf die Interaktion von Telmisartan mit dem ABC-Transporter P-gp zu untersuchen, wurde ein modifizierter Calcein-AM-Assay verwendet. In ersten Untersuchungen konnten wir beobachten, dass Telmisartan und der Referenzinhibitor Verapamil an allen analysierten P-gp-Varianten einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt vermittelten. Die untersuchten P-gp-Mutationen scheinen somit keinen Einfluss auf die Interaktion von P-gp mit Telmisartan oder Verapamil zu haben. Allerdings sind weiterführende Analysen nötig, um zum einen die erhobenen Befunde mit einer größeren Stichprobe zu reproduzieren und zum anderen den Einfluss der Mutationen auf wichtige Charakteristika der Telmisartan-P-gp-Interaktion (insbesondere Bestimmung des  $IC_{50}$ -Werts) zu untersuchen. In der Literatur ist hinlänglich beschrieben, dass P-gp-Mutationen einen Einfluss auf die Substrat-Transporter-Interaktion haben können. Beispielsweise wurde für den Haplotyp I1145I-A893S berichtet, dass die P-gp-Inhibitoren Ciclosporin A und Verapamil im Efflux-Assay mit dem Substrat Daunorubicin in Haplotyp-exprimierenden Zellen weniger effektiv waren als in Wildtyp-exprimierenden Zellen (Kimchi-Sarfaty et al., 2007). Weiterführende Untersuchungen könnten daher dazu beitragen, subtilere Genotyp-bedingte Unterschiede hinsichtlich der Substrat-Transporter-Interaktion aufzudecken.

Im Rahmen unserer experimentellen Analysen konnten wir bei keiner der untersuchten P-gp-Mutanten eine Veränderung im Protein-Expressionsniveau feststellen. Die Proteinexpression von P-gp-Wildtyp und allen untersuchten P-gp-Mutanten (A999T, M986V, A893S, I1145I, S400N und der Haplotyp I1145I + A893S) war vergleichbar. Hoffmeyer et al. zeigten hingegen, dass die Mutation I1145I zu einer signifikanten Reduktion der duodenalen P-gp-Expression des Menschen führte (Hoffmeyer et al., 2000). Owen et al. dagegen konnten keine erniedrigte Proteinexpression der Mutante I1145I in der menschlichen Leber nachweisen (Owen et al., 2005). Inwieweit unsere In-vitro-Befunde auf die komplexe In-vivo-Situation des Menschen übertragbar sind, muss daher in weiterführenden Untersuchungen in repräsentativen Probanden-/Patientenpopulationen ermittelt werden.

In einer klinischen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass Patienten bei einer gleichzeitigen Einnahme von Telmisartan und Nisoldipin eine höhere AUC von Telmisartan aufwiesen als Patienten, die eine Monotherapie erhielten (Bajcetic et al., 2007). Der Grund dafür ist bisher nicht geklärt. Telmisartan wird hauptsächlich durch Glucuronidierung durch die UDP-Glucuronyl-Transferasen metabolisiert (Stangier et al., 2000a). Eine Metabolisierung über das CYP-P450-System ist bisher nicht beschrieben worden. Nisoldipin hingegen wird über das intestinale und hepatische CYP-P450-System metabolisiert (Heinig, 1998). Die Metabolisierung von Nisoldipin und Telmisartan ist also unterschiedlich, und das CYP-P450-System scheint für die Interaktion von Telmisartan mit Nisoldipin nicht verantwortlich zu sein. Telmisartan übt eine inhibitorische Wirkung auf die ABC-Transporter BCRP, P-gp und MRP2 aus (Weiss et al., 2010). Die Wirkung von Nisoldipin auf ABC-Transporter war dagegen nicht bekannt. Möglicherweise ist eine Interaktion von Nisoldipin und Telmisartan auf ABC-Transporter-Ebene verantwortlich für die Zunahme der oralen Bioverfügbarkeit beider Arzneistoffe in der kombinierten antihypertensiven Therapie. In unseren In-vitro-Untersuchungen wurde eine inhibitorische Wirkung von Nisoldipin auf die ABC-Transporter BCRP und P-gp festgestellt. Dieser inhibitorische Effekt zeigte sich auch bei der BCRP-Mutante R482G, bei der Telmisartan keine inhibitorische Wirkung entfaltet. Nisoldipin übte zudem auf die P-gp-Mutanten A999T, M986V, A893S, I1145I, S400N und den Haplotyp I1145I + A893S eine inhibitorische Wirkung aus.

Die inhibitorischen Effekte von Nisoldipin auf den P-gp vermittelten Transport scheinen substratabhängig zu sein. Katoh et al. publizierten, dass Nisoldipin nicht zu einer Inhibition des P-gp-vermittelten Transports von [<sup>3</sup>H]Daunorubicin und [<sup>3</sup>H]Digoxin führt, aber andere 1,4-Dihydropyridin-Calciumkanalblocker wie Nicardipin schon (Katoh et al., 2000). Wir konnten feststellen, dass Nisoldipin den P-gp-vermittelten Transport von Calcein-AM inhibiert. Durch die inhibitorische Wirkung von Nisoldipin auf die ABC-Transporter BCRP und P-gp könnte der Calciumkanalblocker möglicherweise Interaktionen mit anderen Antihypertensiva, wie z. B. Telmisartan, auslösen. Die Interaktion von Telmisartan und Nisoldipin könnte folglich auf der Ebene der ABC-Transporter P-gp bzw. BCRP stattfinden. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um die genaue Ursache der Interaktion beider Antihypertensiva aufzuklären.

Das Tet-System wurde als induzierbares Genexpressionssystem ausgewählt, da durch dieses System die Verhältnisse im menschlichen Organismus nachgeahmt werden können. Es kann die häufig beobachtete Induzierbarkeit von BCRP und P-gp nachempfinden (Greiner et al., 1999; Szatmari et al., 2006). Für BCRP ist beispielsweise bekannt, dass es durch Troglitazon, Rosiglitazon und Chemotherapeutika in seiner Expression in vivo, z. B. intestinal und hepatisch, induziert werden kann (Szatmari et al., 2006). Auch die Expression von P-gp kann durch Arzneistoffe, wie z. B. Rifampicin bzw. Chemotherapeutika, insbesondere im intestinalen Epithel induziert werden (Greiner et al., 1999). Das Tet-System bietet zudem den Vorteil, dass es eine „Dosierung“ des Expressionsniveaus exprimierter Proteine durch Variation der Konzentration von induzierenden Tetrazyklin-Derivaten, wie z. B. Doxyzyklin, erlaubt. Diese Möglichkeit der dynamischen Regulation der Genexpression kann u. a. in zukünftigen Protein-Analysen, wie z. B. der zeitabhängigen Proteindegradation von ABC-Transporter-Mutanten, genutzt werden. Für das generierte BCRP-Responderkonstrukt, das später als Matrize zur Generierung der beschriebenen BCRP-Mutationen diente, konnte im Rahmen der Etablierung und Validierung unseres experimentellen Systems die Induzierbarkeit im Tet-On- bzw. die Reprimierbarkeit im Tet-Off-System nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde die Funktionalität des experimentellen Systems überprüft, und es konnte gezeigt werden, dass sowohl Telmisartan als auch der Referenzinhibitor FTC hier inhibitorisch aktiv waren. Als optimale Doxyzyklin-Konzentration für die Aktivierung des Tet-On-Systems konnte in Konzentrations-Induktions-Versuchen 1 µg/ml bestimmt werden, während eine komplette Repression des Tet-Off-Systems erwartungsgemäß bereits bei niedrigeren Konzentrationen von Doxyzyklin (100 ng/ml) erreicht wurde. In HEK293-Tet-On-Zellen wurde die BCRP-Expression durch Erhöhung der Doxyzyklin-Konzentration bis zu einer Doxyzyklin-Konzentration von 1 µg/ml gesteigert. Ab 10 µg/ml Doxyzyklin ging die BCRP-Expression aber wieder zurück. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte die Bindung von Doxyzyklin an die 30S-Untereinheit der eukaryotischen Ribosomen sein (Joshi und Miller, 1997). Dadurch wird die Bindung der Aminoacyl-tRNA an den ribosomalen Translationskomplex bei der Translation blockiert (Joshi und Miller, 1997), wodurch die Synthese der Proteine (hier möglicherweise von BCRP) verhindert wird. Die BCRP-Expression nimmt dementsprechend wieder ab.



In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung der Interaktion von Telmisartan mit den ABC-Transportern das Tet-On-System verwendet, da die Transkription des Transgens in diesem System bei Bedarf mit Doxyzyklin aktiviert werden kann und ansonsten in einem inaktiven Zustand verweilt. Dies ermöglicht aufgrund der Stabilität des Genprodukts, Doxyzyklin in experimentellen Analysen erneut aus dem System zu entfernen und so unspezifische Effekte der Substanz zu vermeiden.

Für das P-gp-Responderkonstrukt konnte, genauso wie für das BCRP-Responderkonstrukt, die Induzierbarkeit durch Doxyzyklin im Tet-On-System nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse zur Regulierbarkeit der P-gp-Expression ergaben jedoch die Limitation, dass bereits in nicht-induzierten mit dem P-gp-Responderkonstrukt transfizierten HEK293-Tet-On-Zellen eine signifikante und funktionell bedeutsame P-gp-Expression beobachtet werden konnte. Eventuell führt die minimale Restinteraktion des Transaktivators mit dem spezifischen Response-Element des Responderkonstrukts auch in Abwesenheit von Doxyzyklin zu einer geringen Aktivierung des Promotors, so dass eine basale P-gp-Expression stattfindet. Um dieses Problem zu umgehen, wurden untransfizierte HEK293-Tet-On-Zellen als Negativkontrolle verwendet. Diese Zellen zeigten keine funktionell relevante P-gp-Expression und konnten daher als Kontrollzellen für potentiell unspezifische Effekte der Testsubstanzen auf die intrazelluläre Calcein-Akkumulation herangezogen werden. Induzierte Zellen hingegen zeigten eine ausgeprägte P-gp-Expression und einen signifikant stärkeren Calcein-AM-Efflux, der durch Zugabe verschiedener Inhibitoren (Verapamil, Telmisartan bzw. Nisoldipin) fast vollständig aufgehoben werden konnte.

Die beobachteten Effekte *in vitro* lassen sich nicht uneingeschränkt auf die *In-vivo*-Situation übertragen, da die Zustände *in vivo* komplexer sind und durch zahlreiche physiologische Faktoren, wie z. B. hepatische Metabolisierung oder Plasmaproteinbindung, beeinflusst werden. Telmisartan liegt im menschlichen Blutplasma zu 99,5 % an Plasmaproteine gebunden vor (Stangier et al., 2000c), wodurch der freie ungebundene Anteil von Telmisartan, welcher für die inhibitorische Wirkung von Telmisartan an ABC-Transportern verantwortlich ist, reduziert wird. Die beobachteten inhibitorischen Effekte von Telmisartan an ABC-Transportern könnten darum *in vivo* deutlich schwächer ausgeprägt sein als *in vitro*. In dieser Arbeit untersuchten wir

deshalb mit Hilfe des PhA-Efflux-Assays die Auswirkung der Bindung von Telmisartan an Serumalbumin (BSA, HSA) im Hinblick auf die inhibitorische Wirkung von Telmisartan am ABC-Transporter BCRP. Unsere Befunde deuten auf eine starke Bindung von Telmisartan an Serumalbumin hin. Daraus resultierte eine drastische Reduktion des inhibitorischen Effekts von Telmisartan am ABC-Transporter BCRP. Insgesamt lässt sich sagen, dass durch Zugabe von Serumalbumin in das experimentelle System des PhA-Efflux-Assays der inhibitorische Effekt von Telmisartan am ABC-Transporter BCRP fast vollständig aufgehoben wurde. Daher ist zu erwarten, dass die freie Konzentration von Telmisartan im Blutkreislauf nicht ausreicht, um signifikante Interaktionen z. B. an ABC-Transportern der Blut-Hirn-Schranke auszulösen. Diese Überlegungen müssen allerdings durch Befunde klinischer Studien untermauert werden. Enteral hingegen sind inhibitorische Effekte von Telmisartan an ABC-Transportern, wie z. B. P-gp oder BCRP, durchaus denkbar, da im enteralen Kompartiment zum einen die Konzentrationen von Telmisartan im Speisebrei viel höher sind als die Konzentrationen im Blutplasma und zum anderen eine hochaffine Bindung von Telmisartan an Plasmaproteine hier nicht stattfindet.

In HEK293-Zellen sowie in nicht-induzierten HEK293-Tet-On-Zellen, die transient mit dem BCRP-Wildtyp-Responderkonstrukt transfiziert wurden, senkte Telmisartan ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  unspezifisch die PhA-Intensität. Ein Grund für diese unspezifische Abnahme könnte darin begründet sein, dass PhA ähnlich wie Telmisartan sehr lipophil ist und sich im Lipidanteil der Plasmamembran sowie in Zellorganellen mit Membrananteilen anlagert. Im Sinne einer kompetitiven Hemmung der Anreicherung von PhA in der Zellmembran könnten steigende Konzentrationen von Telmisartan PhA aus dem Lipidanteil der zellulären Membrananteile verdrängen und so unspezifisch zu einer Erniedrigung der PhA-Konzentration untersuchter Zellen beitragen. Dies könnte fälschlicherweise als Reduktion der inhibitorischen Potenz bzw. Effizienz der Substanz interpretiert werden. Daher führten wir eine Normalisierung (siehe auch Berechnung der Inhibitions-Ratio) der erhaltenen PhA-Intensitätswerte auf „BCRP-freie“ HEK293-Tet-On-Zellen durch, die im gleichen Maße durch den unspezifischen Effekt von Telmisartan auf die zelluläre PhA-Akkumulation betroffen waren. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die unspezifischen Effekte von Telmisartan im hohen Konzentrationsbereich durch die

Normalisierung der PhA-Fluoreszenzintensitäten auf „BCRP-freie“ HEK293-Tet-On-Zellen größtenteils ausgeglichen werden können.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil ein experimentelles System für die induzierbare Expression der ABC-Transporter BCRP und P-Glykoprotein (P-gp) etabliert, welches auf dem Tet-On-System basiert.

Im zweiten Teil wurden klinisch relevante Mutanten (Einzelnukleotid-Polymorphismen und somatische Mutationen) der beiden ABC-Transporter durch gezielte Mutagenese der validierten Responderkonstrukte generiert und nach transienter Transfektion in HEK293-Tet-On-Zellen exprimiert. Die Mutanten wurden im Hinblick auf ihr Expressionsniveau, ihre zelluläre Verteilung, ihre Transportkapazität und ihre Interaktion mit dem AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Telmisartan untersucht. Telmisartan übte im Pheophorbid-A-Efflux-Assay einen inhibitorischen Effekt auf den BCRP-Wildtyp sowie die BCRP-Mutanten V12M, Q141K, S248P, F431L und F489L aus. Der inhibitorische Effekt von Telmisartan auf die Funktion des BCRP wurde dagegen durch die R482G-Mutation fast vollständig aufgehoben. Der Arginin-Rest an Position 482 im BCRP scheint somit eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Telmisartan mit dem ABC-Transporter zu spielen. In der Immunfluoreszenz-Analyse zeigte sich, dass alle untersuchten BCRP-Mutanten zellmembranständig lokalisiert waren. Western-Blot-Analysen ergaben eine signifikant erniedrigte Proteinexpression der BCRP-Mutanten Q141K und F489L. Folglich könnte bei Individuen, die diese Mutanten tragen, die Pharmakokinetik von Arzneistoffen, welche durch BCRP transportiert werden, beeinflusst sein. Für die BCRP-Mutanten S248P, F431L und F489L konnte eine im Vergleich zum BCRP-Wildtyp geringere PhA-Transportkapazität nachgewiesen werden. Bei der F489L-Mutante könnte die erniedrigte Transportkapazität mit der erniedrigten Proteinexpression dieser ABC-Transporter-Mutante zusammenhängen. Die erniedrigte PhA-Transportkapazität bei den Mutanten F431L und S248P konnte hingegen nicht auf eine reduzierte Proteinexpression zurückgeführt werden.

Die Funktion von P-gp wurde im dritten Teil analog dem BCRP mittels fluoreszenzbasiertem Assay analysiert (Calcein-AM als P-gp-Substrat). Im Calcein-AM-Efflux-Assay zeigte Telmisartan am P-gp-Wildtyp sowie an den P-gp-Mutanten A999T, M986V, A893S, I1145I, S400N und dem Haplotyp I1145I + A893S eine vergleichbare inhibitorische Wirkung. In diesen präliminären Versuchen

beeinflussten die genannten Mutationen somit die Interaktion von Telmisartan mit dem ABC-Transporter nicht signifikant. Auch die Proteinexpressions-Analyse ergab für alle P-gp-Mutanten eine mit dem Wildtyp vergleichbare Expression. Allerdings sind weiterführende Untersuchungen nötig, um die funktionellen Eigenschaften dieser Mutanten und ihre Interaktion mit Telmisartan abschließend beurteilen zu können.

Da AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten in der Therapie des arteriellen Hypertonus häufig mit Dihydropyridin-Calciumkanalblockern kombiniert werden, wurde in der vorliegenden Arbeit zudem der Einfluss von Nisoldipin auf die ABC-Transporter BCRP und P-gp untersucht. Tatsächlich zeigte Nisoldipin in unseren In-vitro-Analysen einen inhibitorischen Effekt auf beide ABC-Transporter, so dass Nisoldipin über diesen Mechanismus möglicherweise Interaktionen mit anderen Antihypertensiva auslösen könnte.

## 7. Literaturverzeichnis

Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* 1972;269(2):192–200.

Ahmed-Belkacem A, Pozza A, Muñoz-Martínez F, Bates SE, Castanys S, Gamarro F, Di Pietro A, Pérez-Victoria JM. Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Res* 2005;65(11):4852–60.

Allen JD, van Loevezijn A, Lakhai JM, van der Valk M, van Tellingen O, Reid G, Schellens JH, Koomen GJ, Schinkel AH. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* 2002;1(6):417–25.

Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 1998;58(23):5337–9.

Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol* 1999;39:361–98.

Angelin B, Arvidsson A, Dahlqvist R, Hedman AN, Schenk-Gustafsson K. Quinidine reduces biliary clearance of digoxin in man. *Eur J Clin Invest* 1987;17(3):262–5.

Bajcetic M, Benndorf RA, Appel D, Schwedhelm E, Schulze F, Riekhof D, Maas R, Böger RH. Pharmacokinetics of oral doses of telmisartan and nisoldipine, given alone and in combination, in patients with essential hypertension. *J Clin Pharmacol* 2007;47(3):295–304.

Baron U. Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res* 1997;25(14):2723–9.

Baron U, Bujard H. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: Principles and advances. *Methods Enzymol* 2000;327:401–21.

Bart J, Hollema H, Groen HJ, de Vries EG, Hendrikse NH, Sleijfer DT, Wegman TD, Vaalburg W, van der Graaf WT. The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP,

MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur J Cancer* 2004;40 (14), 2064–2070.

Battershill AJ, Scott LJ. Telmisartan: a review of its use in the management of hypertension. *Drugs* 2006;66(1):51–83.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979;7(6):1513–23.

Boesch D, Gavériaux C, Jachez B, Pourtier-Manzanedo A, Bollinger P, Loor F. In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. *Cancer Res* 1991;51(16):4226–33.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.

Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986;47(3):381–9.

Chen Z, Robey RW, Belinsky MG, Shchaveleva I, Ren X, Sugimoto Y, Ross DD, Bates SE, Kruh GD. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17 $\beta$ -estradiol 17-( $\beta$ -D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res* 2003;63(14):4048–54.

Choi C. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int* 2005;5:30.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156–9.

Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F, Scherrmann J. Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res* 2004;64(9):3296–301.

Clontech Laboratories. Tet-Off and Tet-On Gene Expression Systems User Manual, 2005. Accessed 6 September 2012.

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86(2): 695-698.

Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001;42(7):1007–17.

Deppe S, Böger RH, Weiss J, Benndorf RA. Telmisartan: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010;6 (7), 863–871.

Diop NK, Hrycyna CA. N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry* 2005;44(14):5420–9.

Doyle L, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* 2003; 22(47), 7340–7358.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(26):15665–70.

Eisenblätter T, Hüwel S, Galla H. Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res* 2003;971(2):221–31.

European Medicines Agency document: EPAR summary for the public, 05-2012 (Dok.-Ref.: EMA/306239/2012 EMEA/H/C/000209) Available from:  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000209/WC500027635.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000209/WC500027635.pdf)  
Accessed 15 May 2013.

Food and Drug Administration. Drug Interaction Studies--Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, 2012:  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf>. Accessed 6 September 2012.

Flint J, Shenk T. Viral transactivating proteins. *Annu Rev Genet* 1997;31:177–212.



Fromm MF. The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54(10):1295–310.

Furukawa T, Wakabayashi K, Tamura A, Nakagawa H, Morishima Y, Osawa Y, Ishikawa J. Major SNP (Q141K) Variant of Human ABC Transporter ABCG2 Undergoes Lysosomal and Proteasomal Degradations. *Pharm Res* 2009;26(2):469–79.

Gill G, Ptashne M. Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature* 1988;334(6184):721–4.

Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity. *Curr Drug Deliv* 2004; 1(1):27–42.

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(12):5547–51.

Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 1995;268(5218):1766–9.

Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* 1999;104(2):147–53.

Gros P, Dhir R, Croop J, Talbot F. A single amino acid substitution strongly modulates the activity and substrate specificity of the mouse *mdr1* and *mdr3* drug efflux pumps. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(16):7289–7293.

Gupta A, Dai Y, Vethanayagam RR, Hebert MF, Thummel KE, Unadkat JD, Ross DD, Mao Q. Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58(3):374–83.

Gupta A, Zhang Y, Unadkat JD, Mao Q. HIV protease inhibitors are inhibitors but not substrates of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310(1):334–41.

Heinig R. Clinical pharmacokinetics of nisoldipine coat-core. *Clin Pharmacokinet* 1998;35(3):191–208.

Henriksen U, Fog JU, Litman T, Gether U. Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *J Biol Chem* 2005;280(44):36926–34.

Henriksen U, Gether U, Litman T. Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2. *J Cell Sci* 2005b; 118 (Pt 7), 1417–1426.

Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:67–113.

Higgins CF. The ABC of channel regulation. *Cell* 1995;82(5):693–6.

Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11(10):918–26.

Hillen W, Berens C. Mechanisms Underlying Expression of TN10 Encoded Tetracycline Resistance. *Annu Rev Microbiol* 1994;48(1):345–69.

Hoffmeyer S, Burk O, Richter O von, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(7):3473–8.

Hollenstein K, Dawson RJP, Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2007;17(4):412–8.

Holló Z, Homolya L, Davis C, Sarkadi B. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta* 1994;1191(2):384–8.

Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol Unserer Zeit* 2007;37(2):120–6.

Homolya L, Holló Z, Germann UA, Pastan I, Gottesman MM, Sarkadi B. Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *J Biol Chem* 1993;268(29):21493–6.

Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, Medina-Pérez WY, Robey RW, van de Laar A, Litman T, Dean M, Bates SE. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res* 2001;61(18):6635–9.

Honjo Y, Morisaki K, Huff LM, Robey RW, Hung J, Dean M, Bates SE. Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis in the ABC half-transporter ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1). *Cancer Biol Ther* 2002;1(6):696–702.

Houghton PJ. Imatinib Mesylate Is a Potent Inhibitor of the ABCG2 (BCRP) Transporter and Reverses Resistance to Topotecan and SN-38 in Vitro. *Cancer Res* 2004;64(7):2333–7.

Hyafil F, Vergely C, Du Vignaud P, Grand-Perret T. In Vitro and in Vivo Reversal of Multidrug Resistance by GF120918, an Acridonecarboxamide Derivative. *Cancer Res* 1993, 53:4595-4602.

Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Miki Y, Sugimoto Y. C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2002;1(8):611–6.

Ishiguro N, Maeda K, Kishimoto W, Saito A, Harada A, Ebner T, Roth W, Igarashi T, Sugiyama Y. Predominant contribution of OATP1B3 to the hepatic uptake of telmisartan, an angiotensin II receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos* 2006;34(7):1109–15.

Ito K, Suzuki H, Horie T, Sugiyama Y. Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharm Res* 2005;22(10):1559–77.

Jitsukawa K, Suizu R, Hidano A. Chlorella photosensitization. New phytophotodermatitis. *Int J Dermatol* 1984;23(4):263–8.

Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, van der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(24):15649–54.

Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JH, Schinkel AH. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(20):1651–6.

Joshi N, Miller DQ. Doxycycline revisited. *Arch Intern Med* 1997;157(13):1421–8.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455(1):152–62.

Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T, Asada S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer* 2002;97(5):626–30.

Kato M, Nakajima M, Yamazaki H, Yokoi T. Inhibitory Potencies of 1,4-Dihydropyridine Calcium Antagonists to P-Glycoprotein-Mediated Transport: Comparison with the effects on CYP3A4 Inhibitory Potencies of 1,4-Dihydropyridine Calcium Antagonists to P-Glycoprotein-Mediated Transport. *Pharm Res* 2000;17(10):1189–97.

Kawahara H, Noguchi K, Katayama K, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. Pharmacological interaction with sunitinib is abolished by a germ-line mutation (1291T>C) of BCRP/ABCG2 gene. *Cancer Sci* 2010;101(6):1493–500.

Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG, Cowan K. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res* 2002;8(1):22–8.

Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, Roden DM, Wilkinson GR. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest* 1998;101(2):289–94.

Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70(2):189–99.

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. *Science* 2007;315(5811), 525–528.

Kondo C, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Kobayashi D, Ieiri I, Mine K, Ohtsubo K, Sugiyama Y. Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2. *Pharm Res* 2004;21(10):1895–903.

Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. *Eur J Pharm Sci* 2000;11(4):265–83.

Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680–5.

Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204(3), 216–237.

Li Y, Polgar O, Okada M, Esser L, Bates SE, Xia D. Towards understanding the mechanism of action of the multidrug resistance-linked half-ABC transporter ABCG2: A molecular modeling study. *J Mol Graph Model* 2007;25(6):837–51.

Lindl T. Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akad Verl, 2002.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4), 402–408.

Loo TW, Clarke DM. Functional consequences of phenylalanine mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J Biol Chem* 1993;268(27):19965–72.

Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. Heidelberg: Spektrum Akad Verl; 2004.

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. Subcellular localization and

distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 2001;61(8):3458–64.

Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 1970;53(1):159–62.

Martin C, Berridge G, Mistry P, Higgins C, Charlton P, Callaghan R. The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* 1999;128(2):403–11.

Mealey KL, Barhoumi R, Burghardt RC, Safe S, Kochevar DT. Doxycycline induces expression of P glycoprotein in MCF-7 breast carcinoma cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(3):755–61.

Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, van Herwaarden AE, Schinkel AH. The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol Pharmacol* 2005;67(5):1758–64.

Mitomo H, Kato R, Ito A, Kasamatsu S, Ikegami Y, Kii I, Kudo A, Kobatake E, Sumino Y, Ishikawa T. A functional study on polymorphism of the ATP-binding cassette transporter ABCG2: critical role of arginine-482 in methotrexate transport. *Biochem J* 2003;373(Pt 3):767–74.

Miwa M, Tsukahara S, Ishikawa E, Asada S, Imai Y, Sugimoto Y. Single amino acid substitutions in the transmembrane domains of breast cancer resistance protein (BCRP) alter cross resistance patterns in transfectants. *Int J Cancer* 2003;107(5):757–63.

Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res* 1999;59(1):8–13.

Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H. Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2. *Int J Cancer* 2004;109(2):238–46.

Morisaki K, Robey RW, Ozvegy-Laczka C, Honjo Y, Polgar O, Steadman K, Sarkadi B, Bates SE. Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56(2):161–72.

Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M, Ikegami Y, Hayasaka S, Sano K, Shiozawa K, Kawabata S, Soda H, Ishikawa T, Tanabe S, Kohno S. Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288(4):827–32.

Neumann M, Wilisch A, Diddens H, Probst H, Gekeler V. MDR hamster cells exhibiting multiple altered gene expression: effects of dexniguldipine-HCl (B859-35), cyclosporin A and buthionine sulfoximine. *Anticancer Res* 1992;12(6B):2297–302.

Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol* 2005;59(3):365–70.

Palmeira A, Sousa E, Vasconcelos MH, Pinto MM. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr Med Chem* 2012;19(13), 1946–2025.

Pauli-Magnus C, von Richter O, Burk O, Ziegler A, Mettang T, Eichelbaum M, Fromm MF. Characterization of the major metabolites of verapamil as substrates and inhibitors of P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293(2):376–82.

Pavek P, Merino G, Wagenaar E, Bolscher E, Novotna M, Jonker JW, Schinkel AH. Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312(1):144–52.

Pirker R, Keilhauer G, Raschack M, Lechner C, Ludwig H. Reversal of multi-drug resistance in human KB cell lines by structural analogs of verapamil. *Int J Cancer* 1990;45(5):916–9.

Ptashne M. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 1988;335(6192):683–9.

Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* 2000;60(1):47–50.

Robey RW, Honjo Y, Morisaki K, Nadjem TA, Runge S, Risbood Mm Poruchynsky MS, Bates SE. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br J Cancer* 2003;89(10):1971–8.

Robey RW, Steadman K, Polgar O, Morisaki K, Blayney M, Mistry P, Bates SE. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res* 2004; 64(4):1242–6.

Sack U, Tárnok A, Rothe G. Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: Karger; 2007.

Sadeque AJ, Wandel C, He H, Shah S, Wood AJ. Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68(3):231–7.

Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 1988;335(6190):563–4.

Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 2006;86(4):1179–236.

Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Német K, Váradi A. ABCG2 - a transporter for all seasons. *FEBS Lett.* 2004;567(1):116–20.

Scherrmann J. Transporters in Absorption, Distribution, and Elimination. *Chem Biodivers* 2009;6(11):1933–42.

Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 1995;96(4):1698–705.

Sharom, F.J. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008;9(1), 105–127.



Shiozawa K, Oka M, Soda H, Yoshikawa M, Ikegami Y, Tsurutani J, Nakatomi K, Nakamura Y, Doi S, Kitazaki T, Mizuta Y, Murase K, Yoshida H, Ross DD, Kohno S. Reversal of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)-mediated drug resistance by novobiocin, a coumermycin antibiotic. *Int J Cancer* 2004;108(1):146–51.

Smit JW, Huisman MT, van Tellingen O, Wiltshire HR, Schinkel AH. Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *J Clin Invest* 1999;104(10):1441–7.

Soldner A, Benet LZ, Mutschler E, Christians U. Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and Caco-2 cell monolayers. *Br J Pharmacol* 2000;129(6):1235–43.

Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH, van Tellingen O. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(5):2031–5.

Stangier J, Schmid J, Türck D, Switek H, Verhagen A, Peeters PA, van Marle SP, Tamminga WJ, Sollie FA, Jonkman JH. Absorption, metabolism, and excretion of intravenously and orally administered [<sup>14</sup>C]telmisartan in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2000a;40(12 Pt 1):1312–22.

Stangier J, Su CA, Hendriks MG, van Lier JJ, Sollie FA, Oosterhuis B, Jonkman JH. The effect of telmisartan on the steady-state pharmacokinetics of digoxin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 2000b;40(12 Pt 1):1373–9.

Stangier J, Su CA, Roth W. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered telmisartan in healthy young and elderly volunteers and in hypertensive patients. *J Int Med Res* 2000c;28(4):149–67.

Stewart CF. Gefitinib Enhances the Antitumor Activity and Oral Bioavailability of Irinotecan in Mice. *Cancer Res* 2004;64(20):7491–9.

Strathdee CA, McLeod MR, Hall JR. Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* 1999;229(1-2):21–9.

Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y. ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* 2003;278(25):22644–9.

Szakács G, Váradi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 2008;13(9-10):379–93.

Szatmari I, Vámosi G, Brazda P, Balint BL, Benko S, Széles L, Jeney V, Ozvegy-Laczka C, Szántó A, Barta E, Balla J, Sarkadi B, Nagy L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J Biol Chem* 2006;281(33):23812–23.

Tamura A, Onishi Y, An R, Koshiha S, Wakabayashi K, Hoshijima K, Priebe W, Yoshida T, Kometani S, Matsubara T, Mikuriya K, Ishikawa T. In vitro evaluation of photosensitivity risk related to genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCG2 and inhibition by drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007a;22(6):428–40.

Tamura A, Wakabayashi K, Onishi Y, Takeda M, Ikegami Y, Sawada S, Tsuji M, Matsuda Y, Ishikawa T. Re-evaluation and functional classification of non-synonymous single nucleotide polymorphisms of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Cancer Sci* 2007b;98(2):231–9.

Tamura A, Watanabe M, Saito H, Nakagawa H, Kamachi T, Okura I, Ishikawa T. Functional validation of the genetic polymorphisms of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: identification of alleles that are defective in porphyrin transport. *Mol Pharmacol* 2006;70(1):287–96.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84(21):7735-7738.

Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 2003;10(2), 159–165.

Thuring R, Sanders J, Borst P. A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Anal Biochem* 1975;66(1):213–20.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76(9):4350–4.

Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* 1982;42(11):4730–3.

Ueda K, Taguchi Y, Morishima M. How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin Cancer Biol* 1997;8(3):151–9.

Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(14):7963–8.

Volk EL, Farley KM, Wu Y, Li F, Robey RW, Schneider E. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res* 2002;62(17):5035–40.

Wakabayashi K, Nakagawa H, Tamura A, Koshihara S, Hoshijima K, Komada M, Ishikawa T. Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein. *J Biol Chem* 2007;282(38):27841–6.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* 1982;1(8):945–51.

Weiss J. Evaluation of inhibitory potencies for compounds inhibiting P-glycoprotein but without maximum effects: f2 values. *Drug Metab Dispos* 2005;34(2):203–7.

Weiss J, Dormann SG, Martin-Facklam M, Kerpen CJ, Ketabi-Kiyanvash N, Haefeli WE. Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305(1):197–204.

Weiss J, Sauer A, Divac N, Herzog M, Schwedhelm E, Böger RH, Haefeli WE, Benndorf RA. Interaction of angiotensin receptor type 1 blockers with ATP-binding cassette transporters. *Biopharm Drug Dispos* 2010;31(2-3):150–61.

Woodahl EL, Yang Z, Bui T, Shen DD, Ho RJ. Multidrug resistance gene G1199A polymorphism alters efflux transport activity of P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310(3):1199–207.

Wu X, Whitfield LR, Stewart BH. Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of P-glycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter. *Pharm Res* 2000;17(2):209–15.

Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, Dagenais G, Sleight P, Anderson C. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 2008; 358(15):1547–59.

Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., Sorrentino, B.P. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001;7(9), 1028–1034.

**8. Abkürzungsverzeichnis**

AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Konzentration-Zeit-Kurve ( <i>area under the curve</i> )
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> ), die aus mRNA mittels reverser Transkriptase gewonnen wird
C <sub>max</sub>	maximale Plasmakonzentration
CYP	Cytochrom P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E.coli	Escherichia coli
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	fetales bovines Serum
FTC	Fumitremorgin C
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i> )
<i>g</i>	Erdbeschleunigung ~ 9,81 ms <sup>2</sup>
AcGFP1	Aequorea coerulescens grün fluoreszierendes Protein
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
HSA	humanes Serumalbumin
IgG	Immunglobulin G
MDCKII	Madin Darby canine kidney, strain II
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NEB	New England Biolabs
par	parenteral
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
P-gp	P-Glykoprotein
PhA	Pheophorbid A

R-PE	R-Phycoerythrin
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )
RPMI	Akronym, hergeleitet von RosWell Park Memorial Institut
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i> )
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	Tris-gepufferte Salz-Tween-Lösung (engl. <i>Tris-buffered-saline-tween</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMD	transmembranäre Domäne
TMT	Telmisartan
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
vs.	versus
WT	Wildtyp

**9. Lebenslauf**

Name	Sylvia Deppe
Geburtsdatum	29.04.1984
Geburtsort	Krefeld

**Akademische Aus- und Weiterbildung**

09/2009 - 10/2012	Promotion am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und klinische Pharmazie der Technischen Universität Braunschweig
06/2009	Approbation als Apothekerin
12/2008 - 05/2009	2. Hälfte des praktischen Jahres in der Delfin-Apotheke in Hannover
05/2008 - 11/2008	1. Hälfte des praktischen Jahres (siehe Auslandsaufenthalte)
10/2003 - 03/2008	Pharmaziestudium an der Technischen Universität Braunschweig
08/1994 - 06/2003	Maria-Sibylla-Merian Gymnasium, Krefeld Abschluss (06/03): Abitur

**Berufstätigkeit**

seit 11/2012	Stationsapothekerin im Klinikum Lüdenscheid
09/2009 - 04/2012	Apothekerin in der Andrea-Apotheke in Hannover
07/2009 - 08/2009	3 Wochen Vertretung der Apothekenleiterin in der Ems-Apotheke in Hövelhof

**Auslandsaufenthalte**

05/2008 - 11/2008	1. Hälfte des praktischen Jahres an der University of British Columbia in Vancouver, Kanada, am Institut für Pharmaceutical Sciences (Forschung der kardiovaskulären Komplikationen im Zusammenhang mit Diabetes)
08/2000 - 05/2001	10 Monate in einer Gastfamilie in Kalifornien, USA, und Besuch der Colfax High School

## Publikationen

**Deppe S**, Böger RH, Weiss J, Benndorf RA. Telmisartan: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010 Jul; 6(7):863-71.

Wang F, Kim MS, Puthanveetil P, Kewalramani G, **Deppe S**, Ghosh S, Abrahani A, Rodrigues B. Endothelial heparanase secretion after acute hypoinsulinemia is regulated by glucose and fatty acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Apr; 296(4):H1108-16

Kewalramani G, Puthanveetil P, Wang F, Kim MS, **Deppe S**, Abrahani A, Luciani DS, Johnson JD, Rodrigues B. AMP-activated protein kinase confers protection against TNF- $\alpha$ -induced cardiac cell death. *Cardiovasc Res*. 2009 Oct; 84(1):42-53.

## Tagungsbeiträge

**Deppe S**, Ripperger A, Benndorf RA. Genetic variants of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: analysis of interaction with the AT1 receptor antagonist telmisartan. *VKliPha-Kongress 2012*; Publikation des Abstracts im British Journal of Clinical Pharmacology 2013; 75(S1):3.

**Deppe S**, Ripperger A, Benndorf RA. Genetic variants of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: analysis of interaction with the AT1 receptor antagonist telmisartan. 36. *Wissenschaftlicher Jahreskongress der Deutschen Hochdruckliga e. V. 2012*, hier ausgezeichnet mit dem *Young Investigator Award*